



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2009年度 8月

博士學位論文

약용식물 추출물의 피부기능성에
관한 연구

2009 年 8 月

朝鮮大學校大學院

生命工學科

柳 敏 貞

약용식물 추출물의 피부기능성에
관한 연구

Skin functional activities of the extracts from
Various medicinal plants

2009 年 8 月

朝鮮大學校大學院

生命工學科

柳 敏 貞

약용식물 추출물의 피부기능성에 관한 연구

指導教授 金成俊

이 論文을 理學博士學位 申請論文으로 제출함

2009年 4 月 日

朝鮮大學校大學院

生命工學科

柳 敏 貞

柳敏貞의 博士學位論文을 認准함.

委員長 朝鮮大學校 教授 梁永基 印

委員 朝鮮大學校 教授 朴悅 印

委員 光州保健大 教授 趙星泰 印

委員 釜山大學校 教授 金炯佑 印

委員 朝鮮大學校 教授 金成俊 印

2009年 6月 日

朝鮮大學校大學院

목 차

LIST OF TABLES.....	iv
LIST OF FIGURES.....	v
ABBREVIATIONS.....	viii
ABSTRACT.....	ix

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법.....	9
II-A. 재료	9
1. 식물재료.....	9
2. 시약	9
3. 피부세포 및 균주배양.....	10
4. 실험에 사용된 기기.....	11
II-B. 방 법	12
1. 식물 추출물의항 미생물 활성 스크리닝	12
1-1. Paper disc법에 의한 추출물의 항균력 분석.....	12
1-2. 추출물의 미생물에 대한 최소 저해농도 (MIC)측정.....	12
2. 식물 추출물이 항산화 활성에 미치는 효과 측정.....	13
2-1. 총 폴리페놀 함량 분석.....	13
2-2. 총 플라보노이드 함량 분석.....	13
2-3. DPPH 라디컬 소거능 분석.....	14
2-4. 아질산염 (Nitric oxide) 소거능 분석.....	14
2-5. 추출물의 HaCaT 세포내 ROS 제거능 측정.....	15
3. 추출물의 HaCaT 세포의 보호효과 측정.....	16
3-1. 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 반응성 측정.....	16
3-2. 3종 Chemical에 의하여 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT	

세포 보호효과 측정	16
4. 추출물의 미백효과 측정	17
4-1. <i>in vitro</i> tyrosinase 저해활성 측정	17
4-2. SK-MEL-2 세포에서 Tyrosinase 저해 활성 측정	17
4-3. SK-MEL-2 세포에서 Melanin 생합성 저해율 측정	18
4-4. α -MSH에 의한 Tyrosinase 활성 및 과 생성 Melanin에 미치는 영향 분석..	18
4-5. Western blot 분석	18
4-6. 통계분석	19
III. 결 과	20
1. 식물 추출물의 항미생물 활성 결과	20
1-1. 염증 유발 피부상재균 (<i>staphylococcus epidermidis</i>)에 대한 항균 활성	20
1-2. 피부상재균, 여드름균, 비듬균에 대한 항균활성	20
1-3. 추출물의 미생물에 대한 최소 저해농도 (MIC) 측정	30
2. 추출물의 항산화 활성결과	32
2-1. 폴리페놀 및 플라보노이드 함량	32
2-2. 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성	34
2-3. 추출물의 아질산염 소거능	37
2-4. 추출물의 HaCaT 세포에 대한 생존율	39
2-5. 추출물의 HaCaT 세포내 ROS 제거능	44
3. 추출물의 HaCa 세포의 보호효과	47
3-1. 산화물질에 대한 HaCaT 세포의 생존율	47
3-1-1. H ₂ O ₂ 농도차이에 따른 세포생존율	47
3-1-2. Rotenone 농도차이에 따른 세포생존율	47
3-1-3. Paraquat 농도차이에 따른 세포생존율	47
3-2. 3종 Chemical에 의하여 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포 보호효과	49

3-2-1. H ₂ O ₂ 에 의한 유발된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과	49
3-2-2. Rotenone에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과	52
3-2-3. Paraquat에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과	55
4. 추출물의 미백활성	58
4-1. <i>in vitro</i> tyrosinase 저해 활성	58
4-2. 추출물에 의한 SK-MEL-2 세포생존율	60
4-3. 추출물이 SK-MEL-2 세포내의 Tyrosinase 활성도 및 Melanin 생성량에 미치는 영향	65
4-4. 추출물이 Melanin 합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향	70
4-5. α-MSH에 의한 Tyrosinase 활성도 및 Melanin 생성량에 미치는 추출물의 효과	72
4-6. α-MSH의 과색소 침착 시 Melanin 합성 관련 단백질 발현에 미치는 추출물의 영향	77
IV. 고 찰	79
V. 결 론	86
VI. 참고문헌	88
감사의 글	109

LIST OF TABLES

Table 1.	List of strains and media used for antibacterial experiments	11
Table 2.	Antibacterial activity of 100 plants ethanol extracts by paper disc diffusion test against <i>S. epidermidis</i>	22
Table 3.	Antibacterial activity of various plant extracts by paper disc diffusion test against <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> and <i>P. acnes</i>	26
Table 4.	Antibacterial activity of various plant extracts by paper disc diffusion test against <i>P. ovale</i> , <i>M. furfur</i> and <i>C. albicans</i>	28
Table 5.	Minimum inhibitory concentrations (MIC) of various plant extracts against microorganisms.....	31
Table 6.	Polyphenolics and flavonoids contents in various plant extracts.....	33
Table 7.	DPPH radical scavenging activity of various plant extracts	35
Table 8-b.	Effect of various plant extracts on HaCaT cells viability...	41
Table 9-a.	Cytotoxic effects of H ₂ O ₂ on HaCaT cells.....	48
Table 9-b.	Cytotoxic effects of rotenone on HaCaT cells.....	48
Table 9-c.	Cytotoxic effects of paraquat on HaCaT Cells.....	48
Table 10-b.	Effects of various plant extracts on viability of SK-MEL-2 cells.....	61

LIST OF FIGURES

Fig. 1.	Melanin biosynthetic pathway.....	3
Fig. 2.	Antibacterial activity of various plant extracts by paper disc diffusion test against <i>S.epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>P. acnes</i>	27
Fig. 3.	Antibacterial activity of various plant extracts by paper disc diffusion test against <i>P .ovale</i> , <i>M. furfur</i> and <i>C. albicans</i>	29
Fig. 4.	DPPH radical scavenging activity of various plant extracts compared with Vitamin C and BHT.....	36
Fig. 5.	Nitrite scavenging activity of various plant extracts.....	38
Fig. 6-a.	Effect of various plant extracts on HaCaT cells viability.....	38
Fig. 6-b.	Effect of various plant extracts on HaCaT cells viability	42
Fig. 6-c.	Effect of various plant extracts on HaCaT cells viability.....	43
Fig. 7-a.	Inhibitory effect of various plant extracts on ROS production in HaCaT cells stimulated with H ₂ O ₂	45
Fig. 7-b.	Inhibitory effect of various plant extracts on ROS production in HaCaT cells stimulated with H ₂ O ₂	46
Fig. 8-a.	Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by H ₂ O ₂ in human HaCaT cells.....	50

Fig. 8-b. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by H ₂ O ₂ in human HaCaT cells.....	51
Fig. 9-a. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by rotenone in human HaCaT cells.....	53
Fig. 9-b. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by rotenone in human HaCaT cells.....	54
Fig. 10-a. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by paraquat in human HaCaT cells.....	56
Fig. 10-b. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by paraquat in human HaCaT cells.....	57
Fig. 11. Tyrosinase inhibitory effect of various plant extracts <i>in vitro</i>	59
Fig. 12-a. Effect of various plant extracts on viability of SK-MEL-2 cells	61
Fig. 12-b. Effect of various plant extracts on viability of SK-MEL-2 cells.....	63
Fig. 12-c. Effect of various plant extracts on viability of SK-MEL-2 cells.....	64
Fig. 13-a. Inhibitory effect of various plant extracts on tyrosinase activity.....	66
Fig. 13-b. Inhibitory effect of various plant extracts on tyrosinase activity.....	67
Fig. 14-a. Inhibitory effect of various plant extracts on melanin production in SK-MEL-2 cells	68
Fig. 14-b. Inhibitory effect of various plant extracts on melanin	

production in SK-MEL-2 cells.....	69
Fig. 15. Inhibitory effect of arbutin, <i>Ephedra sinica</i> and <i>Morus alba</i> on melanogenesis-related protein expression.....	71
Fig. 16-a. Inhibitory effect of various plant extracts and α -MSH on the tyrosinase activity.....	73
Fig. 16-b. Inhibitory effect of various plant extracts and α -MSH on the tyrosinase activity.....	74
Fig. 17-a. Inhibitory effect of various plant extracts and α -MSH on melanin production in SK-MEL-2 cells.....	75
Fig. 17-b. Inhibitory effect of various plant extracts and α -MSH on melanin production in SK-MEL-2 cells.....	76
Fig. 18. Inhibitory effect of arbutin, <i>Ephedra sinica</i> and <i>Morus alba</i> on melanogenesis-related protein expression in the presence of 200 nM α -MSH.....	78

ABBREVIATIONS

- BCA.....Bicinchoninic acid
- BHT.....Butylated hydroxytoluene
- BSA..... Bovine serum albumin
- DCFH-DA.....2',7'-dichlorofluorescein diacetate
- DMEM.....Dulbecco's Modified Eagle's medium
- DMSO.....Dimethyl Sulfoxide
- DPPH..... 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl
- EDTA.....Ethylenediamine tetraacetic acid
- FBS.....Fetal bovine serum
- H₂O₂..... Hydrogen peroxide
- L-DOPA..... L-3,4-dihydroxyphenyl alanine
- NaCl.....Sodium chloride
- NADH.....Nicotinamide adenine dinucleotide
- α -MSH..... α -Melanocyte stimulating hormone
- MTT3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazoliumbromide
- PMSFPhenylmethylsulfonyl fluoride
- PBS.....Phosphate buffer saline
- ROS.....Reactive Oxygen Species
- RPMI 1640.....Roswell Park Memorial Institute
- PVDF.....Polyvinylidene difluoride
- SDS.....Sodium dodecyl sulfate
- TSA.....Tryptic soy agar
- TSB.....Tryptic soy broth

ABSTRACT

Skin functional activities of the extracts from various medicinal plants

Ryu, Min Jeong

Advisor: Prof. Kim, Sung-Jun, Ph. D.

Department of Biotechnology,

Graduate School of Chosun University

This study was carried out to develop the functional skin materials from the extracts of the medicinal plants.

100 plant extracts were examined for anti-bacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and 12 plants were screened. These 12 plant extracts were tested against *S. epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pityrosporum ovale* and along with *Propionibacterium acnes*, *Malassezia furfur* and *Candida albicans* which causes skin inflammation. Paper disc assay and MIC tests were

carried out the various concentrations of extracts. The extracts of *Agastache rugosa* displayed effective growth inhibition against *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. ovale*, *M. furfur*, *C. albicans*. *Aralia cordata* extracts showed the considerable antimicrobial activities on two kinds of microorganisms, *S. epidermidis* and *P. acnes*. Similarly, *Juniperus chinensis* extracts showed antibacterial activities against *S. epidermidis*, *P. acnes* and *M. furfur*. In addition, *A. rugosa* extracts showed low MIC value on *S. epidermidis* (6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *P. ovale* (3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and *C. albicans* (3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A MIC value of *A. pilosa* extracts was 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ on *S. epidermidis*, and *P. acnes* and 3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ on *S. aureus* and *P. ovale*, respectively. Particularly, the extracts of *M. alba* displayed MIC value on 4 types of microbials such as *P. acnes* (6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *P. ovale* (3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *M. furfur* (6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and *C. albicans* (3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Also, the extracts from *Artemisia capillaries*, *Morus alba* and *Thuja orientalis* showed a remarkable MIC values (3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) against *Pityrosporum ovale*. These results indicate that *A. rugosa*, *Morus alba* root bark and *Agrimonia pilosa* whole plant have the potent anti-inflammatory activity on the skin.

Reynoutria elliptica root showed the highest polyphenol content of 209.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *Artemisia capillaries* sprout, *Evodia rutaecarpa* fruit, *Ephedra sinica* and *Plantago asiatica* were also found to contain high polyphenol – 193.20, 176.60, 175.50, 174.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. These five extracts with high polyphenol also contain relatively high flavonoid such as *Reynoutria elliptica* root (83.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *Artemisia capillaries* sprout (138.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *Evodia*

rutaecarpa fruit (73.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *Ephedra sinica* (56.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and *Plantago asiatica* (130.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The DPPH radical scavenging activity of *Ephedra sinica*, *Reynoutria elliptica*, *Evodia rutaecarpa*, *Agrimonia pilosa*, and *Artemisia capillaris* were 90.68 (27.51 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 92.92 (39.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 91.02 (49.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 87.80 (58.41 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 86.64 (86.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$), respectively in the extracts concentration of 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. DPPH radical scavenging activity of these extracts were higher than that of BHT (standard antioxidant). Moreover, we examined nitrate scavenging activity of these extracts on the concentration of 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nitrate scavenging activity was found to decrease in the following order— *Evodia rutaecarpa* fruit, *Ephedra sinica*, *Reynoutria elliptica*, *Artemisia capillaris* and *Plantago asiatica*.

The inhibition effect of the extracts on ROS production was examined in H_2O_2 -treated HaCaT cells. ROS production was significantly inhibited by the extracts of *Evodia rutaecarpa* (42.66%), *Agrimonia pilosa* (47.06%), *Plantago asiatica* (71.11%), and *Ephedra sinica* (71.23%). These inhibition effects were increased in a dose-dependent manner.

Protective effect of extracts on HaCaT cells against H_2O_2 , rotenone, and paraquat were investigated. The 500 μM H_2O_2 -treated cells in the presence of *Ephedra sinica* extract showed an increase in cell viability compared to only H_2O_2 -treated cells. In addition, rotenone-treated cells were protected by *Ephedra sinica* and *Morus alba*.

Tyrosinase catalyzes melanin synthesis in skin melanocytes. Inhibition effects on tyrosinase of the 12 extracts were assayed in a cell-free system and SK-MEL-2 cells. *Ephedra sinica* and *Morus alba* displayed over 50% of tyrosinase inhibition in a cell-free system. *Ephedra sinica* was shown to have potent inhibition effect on tyrosinase and decreased melanin levels compared to arbutin, a standard whitening ingredient. *Ephedra sinica* was also found to control tyrosinase inhibition and melanin biosynthesis more successfully than α -MSH (200nM). *Ephedra sinica* decreased tyrosinase and tyrosinase related protein (TRP- 2) expression level effectively but it didn't affect TRP-1 expression level. These results suggest that *Ephedra sinica* have inhibitory effect on melanin biosynthesis and possesses anti-oxidant and anti-microbial activity.

The overall results of this study indicate that the *Ephedra sinica* and *Morus alba* have the possibility to develop as cosmetic sources for skin-whitening, skin anti-oxidant, skin anti-aging and treatment of skin-related diseases.

I. 서 론

피부의 노화는 복합적인 생물학적 현상으로 피부의 구조와 기능의 변화를 가져오게 되며, 나이가 들어감에 따라 피부의 구조와 생리기능이 퇴화되면서 나타나는 내인성 노화(Intrinsic aging)와 자외선 노출과 같은 외적 요인으로 인해 나타나는 광 노화(photoaging)로 구분 된다 (Kligman *et al.*, 1988 ; Chung *et al.*, 2003). 자외선에 의한 노화는 장기간 태양광에 노출되는 얼굴, 손등, 목의 피부에서 관찰 되는데 피부 각질층이 두꺼워지고, 피부의 구성요소들인 세포 외 기질들이 변성되어 피부의 탄력을 잃게 되고, 깊은 주름이 형성된다. 자외선에 의한 노화에 영향을 미치는 인자는 자외선에 의해 비정상적으로 생성량이 증가되는 활성산소종(ROS)와 자유라디칼(free radical)의 작용이다 (Meinhard *et al.*, 2001).

활성산소종이란 반응성이 매우 큰 1O_2 및 $\cdot OH$ 를 비롯하여 H_2O_2 , $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $ROOH$ 및 $HOCl$ 등을 포함한다. 이들은 고 에너지 복사선, 광증감 반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. 이들 활성산소종중에서 1O_2 및 $\cdot OH$ 은 피부 광 손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하여 피부노화를 가속화 시킨다 (Park, 2003). 멜라닌은 표피의 기저층사이나 기저층의 아래 모낭 등에서 주로 관찰되는 멜라닌 세포로부터 합성되며 세포질 돌기를 통해 각질형성세포로 운반되어 표피멜라닌 단위를 형성한다. 멜라닌 세포내의 멜라닌소체(melanosome)에서 생성된 멜라닌색소는 멜라닌소체의 수상돌기를 통하여 부근에 인접되어 있는 각질세포(keratinocyte)로 이동 하게 되고, 각질세포가 외피로 부상하면서 피부색으로 나타나게 된다. 멜라닌소체는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알

려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)등이 있다. 이 중 tyrosinase 는 멜라닌 합성의 속도결정단계인 초기반응에 작용하는 효소로서, tyrosin을 3,4-dihydroxyphenyl alanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone 으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid 로 산화하고, TRP-2는 DOPA chrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다 (Fig.1) (Kameyama *et al.*, 1993 ; Funasaka *et al.*,1999). 지금까지 알려진 tyrosinase 저해제로는 hydroquinone, resorcinol, 4-hydroxy-anisole, ascorbic acid 과 그 유도체 kojic acid, arbutin, glucosamine, α -viniferin, ferulic acid 등이 있으나 피부 안전성, 제형안전성, 돌연변이 유발, 세포 독성 등의 문제로 인해 첨가제로 제한된 양만 사용되고 있다 (Ikeda, *et al.*,1990 ; Qui, *et al.*, 1996).

식물의 이차대사산물은 예로부터 의약, 향신료, 기호식품, 염료 등과 같이 인간생활에 매우 유익하게 사용되어 있다. 천연에서 얻을 수 있는 대부분의 항산화물질들은 phenol 성 화합물이나 flavonoid 계통의 화합물로 알려져 있고 특히 식물계 내에는 대부분 phenol 성 화합물이 분포되어 있는 것으로 보고되고 있다 (Ozeki *et al.*, 1993).

피부질환 개선과 관련된 약용식물은 황금 (Park, 2003), 울피 (Jung *et al.*, 2005), 백련 (Jeong, 2005), 울금 (An *et al.*, 2006), 백강잠 (Ann, 2006), 오가피(Kim, 2006), 배나무 절지 (Lee *et al.*, 2006), 싸리나무 (Ann, 2006), 순비기나무 (Joo *et al.*, 2007), 하수오, 황정, 마황 (Kim, 2008), 갈근, 복령, 황련 (kim, 2008), 삼백초 (Park, 2008)등이 보고되었다.

본 연구에서 사용한 100여종의 약용식물 중 배초향(*Agastach rugosa*)은 일명 방아풀, 곱향, 토곱향 이라 불리는 꿀풀과(Labiatae)의 다년초 식물로서 지리적으로 일본, 중국, 만주, 대만 등의 동아시아 지역에 분포하며 우리나라에서는 전국의 산야, 계곡, 약간의 습기가 있는 곳 등에 자생하고 있다.

배초향은 phenylpropanoide 계 정유 성분으로 anethole, ansialdehyde 등이 그리고 terpene계 정유로 α -limonene, β -methoxycinnamaldehyde, α -pinene 등이 함유되어 있으며 (Itokawa *et al.*, 1981 ; Ahn, 1998), 항산화 활성 (Lee, 2007), 항균활성 (Park, 2000 ; Lee *et al.*, 2002) 등이 보고되어 있다.

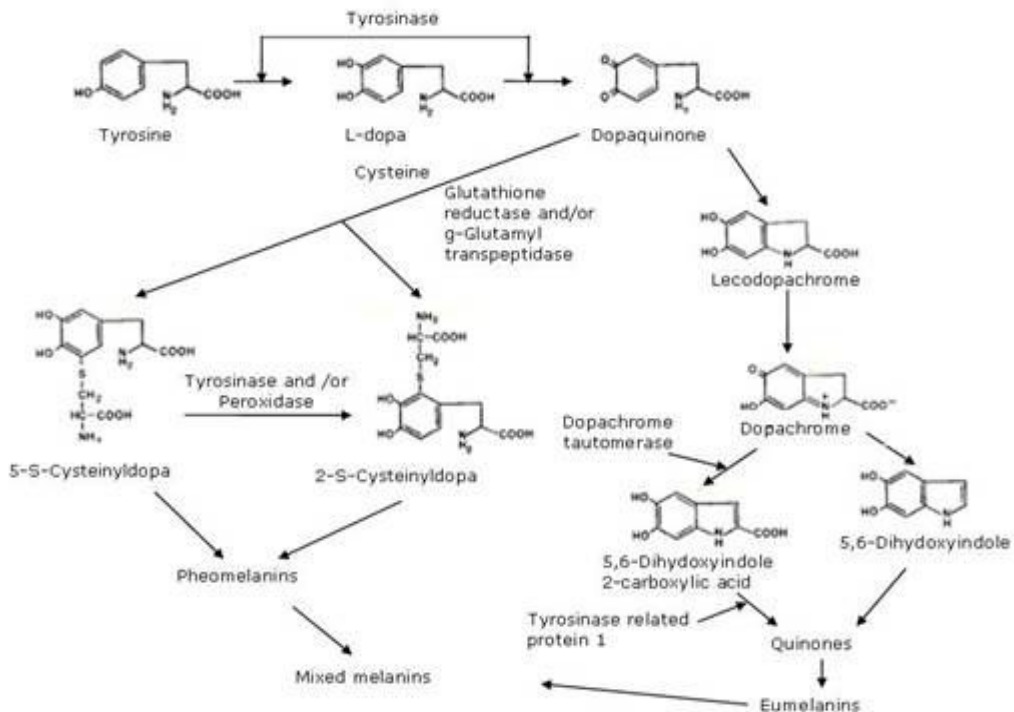


Fig.1. Melanin biosynthetic pathway

짚신나물 (*Agrimonia pilosa*)은 장미과(Rosaceae) 식물로서 한의학에서는 용아초, 선학초 라고 하며 청열해독약으로 사용된다. 주요 성분으로는 agrimonin, agrimonolide, tormentic acid, ellagic acid 등이 있고 잎과 줄기에는 특히 luteolin-7-glucoside가 함유되어 있으며 (Kang, 1992), 항균작용 (Lee *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2006)등이 보고되어 있다.

독활(*Aralia contientalis*)은 다년초로서 한국, 중국, 일본 등의 산지나 그

늘에서 야생 또는 재배되고 있는 식물이다. 성분으로는 β -sitosterol, daucosterol, continentalic acid, ferulic acid, caffeic acid 등이 함유되어 있으며 (대한 약전, 1998), 항균작용 (Han, 2005), 항염증효과 (Kim and Kang, 1998 ; Park *et al.*, 2005) 등이 보고되어 있다.

사철쭉(*Artemisia capillaris*)은 국화과(Compositae) 쭉 속에 속하며, 한국을 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 및 유럽 등에 분포하고, 번식력이 강한 다년생 초본으로 높이 30~100cm 내외이며 (대한 약전, 1998), 항균작용 (Choi *et al.*, 2008), 항암효과 (Lee *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2008) 등이 보고되어 있다.

초마황(*Ephedra sinica*)은 마황과 속하는 다년생 초본 혹은 초본성 목본으로 한의학에서는 발한, 해열, 진해, 항염증의 목적으로 이용되어온 생약으로 ephedrine, pseudoephedrine, ephedroxane, norephedrin 등을 함유하고 있으며, 항염증 작용, 교감 신경흥분 작용, 이뇨 작용 (Duncan *et al.*, 1957 ; Dullo *et al.*, 1991), 면역 활성화 작용 (Kim *et al.*, 1991 ; Kim *et al.*, 2005), 미백 효과 (Kim, 2008) 등 많은 작용이 보고되어 있다.

오수유는 운향과(Rutaceae)에 속한 오수유(*Evodia rutaecarpa*)의 성숙한 과실을 건조한 것이다. 성분으로 evodiamine, rhesifoline, ocimene, evodene, evodin, rutaecarpin, zimonin 등이 있으며 (Nakasato *et al.*, 1962), 신경 세포의 보호효과 (Kim, 2003), 항균작용 (Jeon, 2003), 항암효과 (Yun *et al.*, 2008) 등이 보고되어 있다.

향나무는 늘푸른큰키나무 향나무(*Juniperus chinensis*)의 가지·잎·종자·나무 껍질이다. 성분은 amentoflavone, hinokiflavone, apigenin 등이 함유되어 있으며 (Ahn, 1998), 정유성분 (Kim *et al.*, 1991), 분류학적 연구 (Kim, 1988), 성분 분석 (Bae *et al.*, 2005) 등이 보고되어 있다.

뽕나무(*Morus alba*)는 전국에 재식하며 일본, 만주, 몽골 등 동아시아에 널리 분포한다. 뿌리껍질을 상백피라 부르며, 항바이러스, 항균작용 (Ishitsuka *et al.*, 1982 ; Park *et al.*, 1995 ; Mok *et al.*, 2001 ; Yoo *et al.*, 2003),

모발성장 효과 (Lee *et al.*, 2000), 항염증 효과 (Cheong *et al.*, 1998 ; Yoon *et al.*, 1998), 비만 세포 억제 (Kim and Jun, 1986 ; Lee, 1999)의 효과와 rutin 과 oxyresveratrol 과 같은 물질이 있어 기능성 화장품에 원료로 사용되고 있다 (Ikeda and Tustsumi, 1990).

질경이(*Plantago asiatica*)는 질경이과(Plantaginaceae)의 다년생 초본으로 도로와 건물주변의 다년생 귀화식물이다. 예로부터 독성이 낮아 부드러운 잎과 줄기는 민가에서 식용하거나 즙을 내어 고기와 기름을 혼합하여 고추장에 부쳐서 먹었으며 (Davidson, 1989), 항균작용 (Jeon *et al.*, 1998 ; Jeong *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 1999), 1-propanol, linalool, 2-propamide, 7-methyl-1-octene, 1-octadecanol, 2,7-dimethyloctanol의 향기 성분 (Jan *et al.*, 2005), 고 콜레스테롤 혈증 개선효능 (Lee *et al.*, 2005), 위염 및 위궤양에 미치는 영향 (Won *et al.*, 2004) 등이 보고되어 있다.

노루발풀(*Pyrola japonica*)은 파혈단, 동독, 녹제초 등으로 불리는 노루발과의 상록 여러해살이풀로 우리나라와 일본 등의 산기슭에서 자생하며, pyrolatin, chimaphilin, monotropein quercetin, ursolic acid, oleanolic acid, hentriactane 등 성분이 분석되었고 (Kosuge *et al.*, 1985 ; Lee *et al.*, 2001 ; Chang, 2004 ; Kim *et al.*, 2004), 항균 작용 (Park *et al.*, 2006) 등이 보고되어 있다.

호장(*Reynoutria elliptica*)은 마디풀과에 속하는 다년초인 초본으로 천식, 고혈압, 암, 동맥경화 등의 여러 질병을 치료하기 위하여 우리나라를 비롯하여 동양권의 전통의학에서 이용되어 왔으며 (Vastano *et al.*, 2000), 신경보호 효과 (Kim *et al.*, 2008), 항염증 작용 (Rho *et al.*, 2001), 항산화작용 (Kim *et al.*, 2007), 화장품 약리활성 (Kim *et al.*, 2007), 항균작용 (Lee *et al.*, 2003) 등이 보고되어 있다.

측백나무(*Thuja orientalis*)는 중국이나 우리나라의 단양, 안동, 대구의 석회암 지대 해발 200~600m 에 자생하는 상록 교목으로 (Lee *et al.*, 2002), 서등(Seo *et al.*, 2003)은 측백나무에서 추출된 정유의 생리활성을 보고 하였으

며, 항균작용 (Lee, 1999 ; Oh and Kim, 2006), 발모효과 (Tak *et al.*, 2007), 미백(Lee *et al.*, 2005) 작용 등이 보고되어 있다.

피부질환을 일으키는 원인은 무수히 많으나 첫째, 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인 둘째, 외상, 열, 방사능 같은 물리적 원인 셋째, 내인성 또는 외인성 화학물질에 의한 화학적 원인 넷째, 항원항체 반응에 관련되는 면역학적 원인으로 크게 구별 된다 (대한 병리학회, 1995). 피부와 점막은 외부로부터 유입되거나 또는 내부에서 생겨난 유해한 인자들로부터 개체를 보호하는 강력한 방어체계를 갖는다. 이러한 방어체계의 중요한 요소로 작용하는 것은 정상피부의 pH, 수분량, 피부에서 배출되는 피지, 지방산, 요소와 같은 물질이다. 그러나 어떤 특정 원인에 의해 피부방어체계가 붕괴되면 바이러스와 미생물에 의해 여러 피부질환이 유발되는 것으로 알려져 있다 (대한 피부과학회, 2001). 이 중에서 피부질환을 유발시키는 것으로 보고된 미생물로는 여드름 원인균으로 알려진 *Propionibacterium acnes*, 아토피 피부염의 악화를 초래하는 원인균으로 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, 비듬과 모낭염의 원인균인 *Pityrosporum ovale*, *Malassezia furfur*, 무좀과 칸디다증의 유발균인 *Candida albicans* 등이 성장하게 된다 (Kearney, 1984).

여드름의 약물치료는 직접 발라주는 국소요법제와 내복약을 통한 전신 요법이 사용되고 있다. 그러나 현재 사용되고 있는 erythromycin, isotertinoun, benzoyl peroxide, vitamin A, triclosan 및 azelaic acid 등의 약물제들은 구순염, 점막 건조감, 기미, 혈전증 등의 부작용과 항생제 내성균주의 출현, 치료 중단 시의 재발 등의 문제점이 보고되고 있다 (Lee *et al.*, 1990 ; Sohn *et al.*, 2006).

최근 피부질환에 대한 항균력을 지닌 물질을 천연식물에서 찾고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있는데 대표적으로 천연물 500종의 *Propionibacterium acnes* 에 대한 항균활성 (Sohn *et al.*, 2006), 오일의 항균효과 (Lim *et al.*, 2004), 싸리나무추출물의 항균효과 (Ann *et al.*, 2006), 백련추출물의 항비듬 효과 (Jeong, 2006)에 대한 연구 등이 있다.

활성산소종은 피부에 염증을 유발시키고 피부 면역기능을 억제시켜 세균 감염 등을 증가시켜 결국에는 탄력 감소, 민감, 위축, 주름 및 기미, 주근깨 등으로 이어지면서 피부노화를 가속화시키는 원인이 된다 (Ozeki *et al.*, 1993). 따라서 피부 노화를 지연시키고, 억제하기 위해서는 생체 내뿐만 아니라 피부에서 과잉의 활성산소종 생성을 억제하고 생성된 활성산소를 제거할 수 있는 물질이 개발 되어야 한다.

피부노화와 관련이 깊은 항산화 물질은 동· 식물계에 널리 분포되어 있는데, 과일과 채소에 많은 phenol 화합물, flavonoid 유도체, 토코페롤, 아스코르빈산, 셀레늄과 같은 항산화 물질은 지방의 산화를 지연시키거나 방지하며 노화 방지에도 중요한 역할을 한다 (Block *et al.*, 1994). 최근 노화 억제와 관련된 천연 항산화 물질에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다 (Wiedow *et al.*, 1990).

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 합성되어 수상돌기를 통하여 표피의 각질화세포로 이동되어 피부의 색을 나타내고, 자외선이나 외부 자극물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능이 있는 반면 과도한 색소침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 미용적인 면에서 부정적인 기능을 나타내기도 한다 (Hara *et al.*, 2000 ; Ortonne, 2002). 최근 기미 주근깨 등의 색소 침착을 예방하거나 제거하려는 목적으로 tyrosinase 활성 억제에 효과가 있는 미백치료제를 활발히 연구하고 있으며. 현재까지 tyrosinase 억제제로 알려진 물질로는 4-hydroxyani sole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone와 kojic acid, arbutin, oxyresveratrol 등이 있으며 그 외에도 stilbene계 화합물이 α -viniferin isoflavonoid류인 ferulicacid가 알려져 있다 (Dawley *et al.*, 1993 ; Maeda *et al.*, 1991). 최근 천연식물에서 멜라닌 생성 억제 물질을 찾고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있는데 대표적으로 여로 추출물 (Jin *et al.*, 2002), 백련추출물 (Jeong, 2005), 백삼과 홍삼추출물 (Hwang *et al.*, 2006), 행인의 추출물 (Kim *et al.*, 2007), 갈근, 복령 및 황련추출물 (Kim, 2008), 삼백초 추출물 (Park *et al.*,

2008) 등이 알려져 있다.

본 연구에서는 보다 안전하고 우수한 피부기능성 물질과 제품을 천연물에서 개발하고자, 약용식물 100종을 구입하여 *S. epidermidis* 균에 대한 항균활성을 1차 스크리닝 하여 12종의 추출물을 선발하였다. 1차 선발된 추출물에 대하여 피부에 염증을 유발하는 균에 대한 항균 효과와 항산화 기능을 가지는 성분의 함량을 확인하고, 인간유래 정상 피부각질 세포인 HaCaT 세포에 산화적 스트레스를 유도하여 HaCaT 세포 보호 효과, SK-MEL-2 세포내 tyrosinase 활성과 멜라닌 형성에 미치는 영향을 관찰하고, 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현 변화를 조사하였다. 또한, 멜라닌 자극 호르몬인 α -MSH를 처리하여 과색소현상을 유도한 후 피부 미백작용을 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

II-A. 실험재료

1. 식물재료

본 실험에서 사용된 약용식물 100종은 전남생약농업협동조합 (화순, 한국)에서 구입하여 absolute ethanol을 이용하여 추출하였다. 추출방법으로 Heating mantle에서 시료중량의 약 10배의 absolute ethanol로 3회 반복 환류 추출하였다. 각각의 시료 추출물은 여과지 (Whaman No.2)를 이용하여 여과 한 후 rotary evaporator (EYELA N-1000, Japan)로 감압 농축하여 에탄올을 완전히 제거한 후, 동결 건조하여 -20°C 에 보관하면서 사용하였다.

2. 시약

항산화능 검증 실험에 사용된 시약인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Butylated hydroxytoluene (BHT), Ascorbic (Vitamin C), 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다.

미백 효과 측정에 사용된 시약인 Mushroom Tyrosinase (5370 unit/mg), L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다.

산화적 스트레스 보호 효과 측정에 사용된 시약인 Hydrogen peroxide (H_2O_2), Rotenone, Paraquat 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양을 위한 시약은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), Fetal Bovine Serum (FBS),

Penicillin, Trypsin-EDTA, 0.4% Trypan Blue Stain 은 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA)에서 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다.

항균력 검색 실험에서 사용한 배지는 Tryptic Soy Broth (SB, Difco), Yeast Extract, Malt Extract, Peptone, Dextrose, Tryptone, Bacto agar를 Difco에서 구입하여 사용하였다

3. 피부세포 및 균주 배양

본 실험에 사용한 HaCaT (Human keratinocyte) 세포는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에 10% Fetal Bovine Serum (FBS)와 항생제 (Antibiotic antimycotic)를 첨가하여 생육배지로 사용하였고, 악성 흑색종 (melanoma) 세포주인 SK-MEL-2 세포는 RPMI 1640배지에 10% FBS와 항생제 (Antibiotic antimycotic)를 첨가하여 생육배지로 사용하였다. 모든 세포주는 37°C, 5% CO₂의 습윤화된 incubator에서 적응시켜 배양하였다. 세포는 2~3일마다 culture dish의 80 % 정도까지 자랐을 때 계대 배양하였다.

항균 실험에 사용한 균주는 피부상재균 중 염증을 유발하는 균주 3종과 Yeast에 속하는 모낭염 및 비듬의 유발균 2종 그리고 무좀과 칸디다증의 원인 균 1종을 Table 1.에 나타낸 바와 같이 배양하였다.

Table 1. List of strains and media used for antibacterial experiments.

Strains	Culture collection	Optimum condition	
		Media	Temp
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC1917	TSB /TBA	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC12692	TSB /TBA	37°C
<i>Propionibacterium acnes</i>	KCTC3329	TSB/ TBA	37°C
<i>Pityrosporum ovale</i>	ATCC112078	YMB/YMA	37°C
<i>Malassezia furfur</i>	ATCC14521	YMB/YMA	37°C
<i>Candida albicans</i>	KCTC7965	YMB/YMA	37°C

4. 실험에 사용된 기기

rotary vacuum evaporator (Tokyo Rikakikai Co., Japan), freeze dryer (Ilsin, Korea), UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Hitachi, Japan), shaking water bath (Hanbaek Co., Korea), pH meter (Orin Research, Inc. U.S.A), inverted fluorescence microscope (Nikon, Japan), CO₂ Incubator (Hanback Scientific Co., Korea), autoclave (Hanbaek Scientific Co., Korea), microplate reader (Molecular Devices, USA), 등을 사용하였다.

II-B. 실험방법

1. 식물 추출물의 항미생물 활성 스크리닝

1-1. paper disc법에 의한 추출물의 항균력 분석

추출된 항균성 물질의 항균력 검색은 paper disc법을 사용하였다 (Davidson, 1989). 순수 분리된 각 균주의 단일집락을 취해 10 ml의 균 생육 액체배지에 접종하여 각각 균주의 생육적온에서 18~24시간씩 3회 배양한 후 항균활성 시험 균주로 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각 균주의 15%의 한천이 첨가된 생육배지를 멸균하여 petridish에 15 ml 씩 분주하여 기층용 배지를 응고 시키고, 각각의 시험 균 농도를 650 nm에서 optical density (O.D)값이 0.4 (10^6 CFU/ml)가 되게 한 후 0.7% 한천이 첨가된 중층용 배지에 무균적으로 가하여 잘 혼합한 다음 기층용 배지 위에 분주한 다음 고르게 응고시켜 이종의 균 접종 중층배지를 만들었다. 충분히 굳은 고체배지 위에 멸균된 8 mm paper disc를 올려놓은 후 0.5~0.125 mg/disc가 되도록 추출물을 흡수시킨 다음 37°C에서 12~24시간 동안 배양 후 disc 주위의 clear zone을 관찰하였다.

1-2. 추출물의 미생물에 대한 최소 저해농도 (MIC) 측정

최소저해농도는 broth microdilution방법에 따라 다음과 같이 측정하였다 (Amster, 1996). 각각의 균 농도를 650 nm에서 O.D값을 0.4 (10^6 CFU/ml)가 되게 한 후 well plate에 분주하고 각 시료를 0, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 μ g/ml 농도로 10 μ l 씩 처리하여 24시간 배양하였다. 세균의 증식 정도를 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 통해 650 nm에서 측정하였다.

2. 식물 추출물이 항산화 활성에 미치는 효과 측정

2-1. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀함량은 Folin-Denis법에 따라 (AOAC, 1990), 추출물 0.1 g에 methanol 10 ml을 가하여 70°C에서 30분 동안 추출한 후 1 mg/ml로 희석하여 사용하였다. 검액 50 μ l에 증류수 650 μ l를 넣은 후 Folin-Denis reagent를 50 μ l가하여 3분 동안 실온에서 반응시킨다. 반응시킨 후 10% Na₂CO₃ 포화용액을 100 μ l을 첨가하고, 최종 볼륨을 1 ml로 맞추기 위해 증류수 150 μ l을 넣어 잘 혼합시켰다. 37°C water bath에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer (Pharmacia Biotech ultrospec-2000)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 tannic acid (Sigma Co., USA)의 농도를 0~500 μ g/ml이 되도록 하고 이로부터 총 페놀 함량을 구하였다.

2-2. 총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 Davis 등의 방법에 따라, 추출물 0.1 g에 methanol을 10 ml을 가하여 70°C에서 30분 동안 추출한 후 1 mg/ml로 만들어 사용하였다 (Swaim T *et al.*, 1959). 검액 100 μ l에 1 ml의 diethylene glycol을 첨가하고 다시 1N NaOH 100 μ l을 넣어 잘 혼합시켜 37°C water bath에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer (Pharmacia Biotech ultrospec-2000)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 naringin (Sigma Co., USA)의 농도를 0~300 μ g/ml이 되도록 하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

2-3. DPPH 라디칼 소거능 분석

항산화 활성 검색은 DPPH법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하는 Blois의 방법 약간 변형하여 측정하였다 (Blois, 1958). DPPH 용액 100 μM 과 농도별 추출물을 각각 100 μl 씩 취하여 혼합한 30분간 암 상태에서 방치한 후 잔존 radical 농도를 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성 (Scavenging activity)으로 표시하며, IC_{50} 은 DPPH 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양 (μg)으로 나타내었다. 항산화 물질로 잘 알려진 BHT와 Vitamin C (ascorbic acid)와 비교하였으며, 다음 식으로 전자공여능 (%)을 구하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2-4. 아질산염 (Nitric oxide) 소거능 분석

아질산염 소거작용을 Gray와 Dugan의 방법에 의하여 측정하였다 (Gray and Dugan, 1975). 1mM NaNO_2 용액 1 ml에 일정농도의 시료 1 ml를 가하고 0.1N HCl (pH 1.2)로 반응용액의 pH를 1.2로 조정하여 다음 총량을 10 ml로 하였다 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 ml씩 취하여 2% 초산용액 5 ml과 Griess시약 0.4 ml을 가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 실온에서 15분간 방치한 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정, 잔존하는 아질산염을 구하여 소거작용은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율로써 나타내었다

$$\text{소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2-5. 추출물의 HaCaT 세포내 ROS 제거능 측정

가) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

HaCaT 세포 생존율 측정은 Mosmann의 방법에 의하여 실시하였다 (Mosmann, 1983). 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 세포를 1×10^4 cell/well의 농도가 되도록 조절 하여 분주 후 24시간 배양하여 부착화 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후 추출물을 최종 농도 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고 24시간 동안 배양 하였다. 배양 완료 후 각 well에 MTT용액 (5 mg/ml in PBS) 10 μl 씩을 가해주고, 다시 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 습윤 배양기에서 4시간 동안 반응하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO 150 μl 로 잘 녹여서 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나) 세포내 ROS 제거능 평가

활성산소 측정에 사용되는 2',7'-dichlorofluorecein diacetate (DCFH-DA)를 이용하여 세포 내에 존재하는 활성산소의 정도를 형광분석법으로 측정하였다 (Rosenkranz *et al.*, 1992). 96 well plate에 HaCaT 세포를 1×10^4 cell/well의 농도로 분주한 후 24시간 배양하여 부착 및 안정화 하였다. 24시간의 부착 및 안정화가 끝난 후, 12종 추출물을 세포생존율에 따라 정해진 농도로 처리하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, DMSO에 녹아 있는

DCFH-DA를 20 μM 농도로 처리하고 20분간 배양한 다음, 생육배지를 제거하고 PBS로 수세하였다. 활성산소 제거능 측정을 위하여 H_2O_2 를 최종 농도 100 μM 로 처리하고 형광을 측정하였다 (excitation : 484 nm, emission : 530nm)

3. 추출물의 HaCaT 세포 보호효과 측정

3-1. 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 반응성 측정

H_2O_2 , Rotenone, Paraquat를 사용하여 HaCaT 세포의 산화적 스트레스에 대한 반응성을 측정하였다. HaCaT 세포를 1×10^4 cell/well 로 분주하고, 24시간 배양하여 부착 및 안정화를 시행 하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 과산화수소 (Hydrogen peroxide, H_2O_2), Rotenone, Paraquat 배양액에 희석하여 24시간 동안 반응 시킨 다음 MTT assay로 생존율을 측정하였다.

3-2. 3종 chemical에 의하여 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포 보호 효과

H_2O_2 , Rotenone, Paraquat에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과를 관찰하기 위하여 O'Toole 등의 방법을 응용하여 실험하였다 (O'Toole *et al.*, 1996). 96well plate에 HaCaT 세포를 well당 1×10^4 cell/well 로 분주하고, 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행 하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 세포생존율에 따라 12종의 추출물을 2시간 전 처리하여 배양액을 씻어낸 후, 최종 농도 500 μM 의 H_2O_2 , 1.25 μM 의 rotenone , 500 μM 의 paraquat를 함유한 배양액을 투여하여 24시간 동안 반응시킨 다음 MTT assay로 생존율을 측정하였다.

4. 추출물의 미백효과 측정

4-1. *in vitro* tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법에 따라 측정하였다 (Yagi *et al.*, 1986). 반응구는 0,175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 ml에 10 mM L-DOPA 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/ml) 0.2 ml을 첨가하여 37°C 에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPAchrome 475 nm파장에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무 첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

4-2. SK-MEL-2 세포에서 Tyrosinase 저해활성 측정

SK-MEL-2 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 세포를 1×10^4 cell/well로 각각의 세포생존율에 따라 농도를 처리한 후 48시간 배양하였다. 양성 대조군으로 arbutin을 사용하였다. 48시간 배양한 후 각 well를 10 mM PBS로 세척 하였으며, 1% Triton X-100 을 함유한 10 mM PBS 100 μ l에 현탁시켰다. 현탁된 이 액을 vortexing 한 후 1000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 활성측정 효소액으로 사용하였다. 96 well plate에 이 효소액을 40 μ l 넣고 기질인 L-dopa (2mg/ml) 100 μ l를 첨가하였다. 37°C에서 1시간 동안 반응을 진행시킨 뒤, microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성도는 대조군의 흡광도에 대한 백

분율로 계산하였다 (Roserts *et al.*, 1996).

4-3. SK-MEL-2 세포에서 Melanin 생합성 저해율 측정

Melanin 생성량 측정은 멜라닌 정량은 Hosei등 (Hosoi *et al.*, 1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. SK-MEL-2 세포를 배양하여 24well plate에 각 well당 세포를 1×10^4 cell/well로 각각의 세포생존율에 따라 농도를 처리한 후 48시간 배양하였다. 양성 대조군으로 arbutin을 사용하였다. 48시간 배양한 후 각 well를 PBS로 세척한 후 0.2N NaOH 용액 400 μ l를 첨가하고 60°C에서 1시간 동안 용해하였으며, microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4-4. α -MSH에 의한 Tyrosinase 활성 및 과생성 Melanin에 미치는 영향 분석

외부자극에 따른 SK-MEL-2 세포 내 tyrosinase의 활성 및 과생성멜라닌에 각 추출물이 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 외부자극제로 α -MSH (200 nM)을 사용하였다. Tyrosinase 활성도와 과생성멜라닌의 생성량 측정은 방법은 4-3,4-2의 방법을 그대로 이용 하였으며, 세포생존율에 따라 농도 별로 조제한 각 추출물, arbutin을 전처리하고 1시간 후 α -MSH (200 nM)를 세포에 처리하여 48시간 배양 후, tyrosinase 활성도 및 과 생성멜라닌의 생성량을 측정함으로써 외부자극제에 따른 멜라닌화에 대한 12종의 추출물의 영향을 알아보았다.

4-5. Western blot 분석

SK-MEL-2 세포를 60 Φ dish에 1×10^4 cell/well 개씩 세포를 부착 시키고, *Ephedra sinica*, *Morus alba*, arbutin 을 50, 100 μ g/ml 처리하고 1시간 후

α -MSH (200 nM)를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양된 세포를 수거하여 lysis buffer (RIPA buffer 1 ml, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 2 mM DTT)로 4°C에서 30분간 용해시킨 후 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 단백질은 Bradford 시약을 이용하여 정량하였고, 50 μ g 단백질과 5×sample buff (1 ml glycerol, 0.5 ml β -mercaptoethanol, 3 ml 10% SDS, 1.25 ml 1M Tris-HCl, 1~2 μ g bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 9% SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동 하였다.

Nitrocellulose membrane에 전이 시키고 5% non-fat skim milk in TBST로 blocking 시킨 후, mouse polyclonal IgG anti-tyrosinase, rabbit polyclonal IgG anti-TRP-1, rabbit polyclonal IgG anti-TRP-2, mouse monoclonal IgG anti-actin의 antibody를 1:1000으로 희석하여 각각 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, actin은 HRP-conjugate secondary antibody를 1:1000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST로 세척한 후 Westzoi용액으로 발색시킨 뒤 ChemiDoc을 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

4-6. 통계분석

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복으로 평균값으로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA검정을 적용하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

III. 결과

1. 식물 추출물의 항 미생물 활성

1-1. 염증 유발 피부 상재균 (*Staphylococcus epidermidis*)에 대한 항균활성

국내외 약용식물 100종을 absolute ethanol 로 추출한 후 피부 상재균주 중 피부에 염증을 유발할 수 있는 *S. epidermidis* 균에 대한 항균활성을 paper disc 방법에 따라 1차 스크리닝 하였다. 스크리닝 결과 추출물 농도 0.5 mg/disc에서 항균활성 갖는 식물 추출물로 *Agastache rugosa*, *Agrimonia pilosa*, *Aralia contientalis*, *Artemisia capillaries*, *Ephedra sinica*, *Evodia rutaecarpa*, *Juniperus chinensis*, *Morus alba*, *Plantago asiatica*, *Pyrola japonica*, *Reynoutria elliptica*, *Thuja orientalis* 의 총 12종을 확인 하였다 (Table 2).

1-2. 피부상재균, 여드름균, 비듬균에 대한 항균활성

1-1의 실험 결과를 바탕으로 1차 선발된 12종의 추출물에 대하여 피부 상재균주 중 피부에 염증을 유발할 수 있는 *S. epidermidis*, *S. aureus*, 여드름 유발 원인균인 *P. acnes*, 모낭염 및 비듬 원인균인 *P. ovale*, *M. furfur*, 무좀 및 칸디다증의 원인균인 *C. albicans*에 대하여 농도별로 항균활성 실험 하였다.

*S. epidermidis*에서 항균활성이 우수한 추출물은 *Agastache rugosa*, *Juniperus chinensis*, *Morus alba*, *Reynoutria elliptica*, *Thuja orientalis*

등이었다. *S. aureus*에서 *Agastache rugosa*, *Agrimonia pilos*, *Morus alba*가 항균 활성이 우수하였다.

Table 3과 Fig. 2에서 여드름유발 원인균인 *P. acnes*에 대하여서 항균활성이 우수한 추출물은 *Agrimonia pilos*, *Aralia contientalis*, *Ephedra sinica*, *Evodia rutaecarpa*, *Juniperus chinensis*, *Morus alba*, *Plantago asiatica*, *Reynoutria elliptica*, *Thuja orientalis* 등이었다.

Table 4와 Fig 3에서처럼 모낭염 및 비듬 원인균인 *P. ovale*에 대하여서 *Evodia rutaecarpa*, *Plantago asiatica*를 제외한 10종의 추출물에서 항균활성이 나타났고, *M. furfur*에서는 *Pyrola japonica*를 제외한 11종의 추출물에서 항균활성이 나타났다. 무좀 및 칸디다증의 원인균인 *C. albicans*에 대하여서 *Agastache rugosa*, *Morus alba*, *Ephedra sinica*에서 항균활성이 나타났다.

.

Table 2. Antibacterial activity of 100 plants ethanol extracts by paper disc diffusion test against *S. epidermidis*

No	Korean name	Scientific name	Used part	Clear zone
1	석창포	<i>Acorus gramineus Soland</i>	rhizome	+ ^b
2	배초향	<i>Agastache rugosa</i>	aerial part	++ ^c
3	짚신나물	<i>Agrimonia pilosa</i>	whole plant	++ ^c
4	택사	<i>Alismaorientale</i>	rhizome	- ^a
5	부추	<i>Allium tuberosum</i>	leaf	- ^a
6	알로에	<i>Aloe arborescens</i>	stem	- ^a
7	백렴	<i>Ampelopsis japonica</i>	rhizome	- ^a
8	바디나물	<i>Angelica decursiva</i>	root	- ^a
9	바디나물	<i>Angelica decursiva</i>	flower	- ^a
10	바디나물	<i>Angelica decursiva</i>	leaf	+ ^b
11	바디나물	<i>Angelica decursiva</i>	stem	- ^a
12	당귀	<i>Angelica sinensis</i>	root	- ^a
13	사철쑥	<i>Artemisia capillaris</i>	aerial part	++ ^c
14	황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	root	- ^a
15	천남성	<i>Arisaema amurense</i>	tuber	- ^a
16	독활	<i>Aralia contientalis</i>	root	++ ^c
17	범부채	<i>Belamcanda chinensis</i>	rhizome	+ ^b
18	시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	root	- ^a
19	모시풀	<i>Boehmeria nivea</i>	aerial part	+ ^b
20	유황	<i>Boswellia carteri</i>	stem	+ ^b
21	동백나무	<i>Camellia japonica</i>	flower	- ^a
22	동백나무	<i>Camellia japonica</i>	leaf	- ^a
23	홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	flower	- ^a
24	홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	leaf	- ^a
25	더덕	<i>Codonopsis lan ceolata</i>	root	- ^a

No	Korean name	Scientific name	Used part	Clear zone
26	황련	<i>Coptis chinensis</i>	root	- ^a
27	산수유	<i>Cornus officinalis</i>	fruits	- ^a
28	산수유	<i>Cornus officinalis</i>	flower	- ^a
29	불수굴나무	<i>Citrus medica var</i>	leaf	- ^a
30	불수굴나무	<i>Citrus medica var</i>	fruits	- ^a
31	굴나무	<i>Citrus unshiu</i>	pericarp	- ^a
32	울금	<i>Curcuma aromatica</i>	root	+ ^b
33	향부자	<i>Cyperus rotundus</i>	rhizome	- ^a
34	감나무	<i>Diospyros kaki</i>	leaf	- ^a
35	마	<i>Dioscoreas Rhizoma</i>	root	- ^a
36	한련초	<i>Eclipta alba</i>	aerial part	- ^a
37	두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	cortex	- ^a
38	초마황	<i>Ephedra sinica</i>	stem	++ ^c
39	오수유	<i>Evodia rutaecarpa</i>	fruits	++ ^c
40	무화과나무	<i>Ficus carica</i>	stem	- ^a
41	무화과나무	<i>Ficus carica</i>	leaf	+ ^b
42	산개나리	<i>Forsythia saxatilis</i>	fruits	- ^a
43	절파모	<i>Fritillaria thunbergii</i>	bulbus	- ^a
44	치자나무	<i>Gardenia jasminoides Ellis</i>	fruits	- ^a
45	땀무	<i>Geum japonicum</i>	leaf	- ^a
46	조각나무	<i>Gleditsia sinensis</i>	spina	- ^a
47	감초	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	root	+ ^b
48	목화	<i>Gossypium indicum</i>	flower	- ^a
49	목화	<i>Gossypium indicum</i>	root	- ^a
50	머성초	<i>Houttuynia cordata</i>	aerial part	- ^a

No	Korean name	Scientific name	Used part	Clear zone
51	머성초	<i>Houttuynia cordata</i>	aerial part	- ^a
52	향나무	<i>Juniperus chinensis</i>	aerial part	++ ^c
53	맥문동	<i>Liriope platyphylla</i> Wang	Tuber	- ^a
54	금은화	<i>Lonicerae japonica</i>	flower	- ^a
55	구기자	<i>Lycium chinense</i>	fruits	- ^a
56	꽃무릇	<i>Lycoris radiata</i>	stem	- ^a
57	신미	<i>Magnolia</i>	flower bud	- ^a
58	뽕나무	<i>Morus alba</i>	cortex	++ ^c
59	연꽃	<i>Nelumbo nucifera</i>	leaf	- ^a
60	강활	<i>Ostericum koreanum</i>	root	- ^a
61	인삼	<i>Panax ginseng</i>	root	- ^a
62	작약	<i>Paeonia lactiflora</i>	flower	- ^a
63	모란	<i>paeonia suffruticosa</i>	cortex	+ ^b
64	자단향	<i>Pterocarpus santalinus</i>	lignum	- ^a
65	소엽	<i>Perilla frutescens</i>	leaf	+ ^b
66	죽엽	<i>phyllostachysnigra</i>	leaf	+ ^b
67	질경이	<i>Plantago asiatica</i>	leaf	++ ^c
68	노루발	<i>Pyrola japonica</i>	whole plant	++ ^c
69	매실	<i>Prunus mume</i>	fruits	- ^a
70	벚나무	<i>Prunus serrulata</i>	flower	- ^a
71	황	<i>pueraria thunbergiana</i>	root	- ^a
72	무	<i>Raphanus sativus</i>	fruits	+ ^b
73	무	<i>Raphanus sativus</i>	leaf	- ^a
74	지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	root	- ^a
75	호장	<i>Reynoutria japonica</i>	root	++ ^c

No	Korean name	Scientific name	Used part	Clear zone
76	복분자딸기	<i>Rubus coreanus</i>	fruits	+ ^b
77	함초	<i>Salicomia herbacea</i>	whole plant	- ^a
78	땃나무	<i>Sambucus sieboldiana</i>	branch	- ^a
79	오미풀	<i>Sanguisorba officinalis</i>	root	- ^a
80	백단향	<i>Santalum album</i>	cortex	+ ^b
81	방풍	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	root	- ^a
82	삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	leaf	- ^a
83	형개	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	aerial part	- ^a
84	황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	root	- ^a
85	방기	<i>Sinomenium acutum</i>	root	- ^a
86	수수	<i>Sorghum bicolor</i>	fruits	- ^a
87	개구리밥	<i>Spirodela polyrhiza</i>	aerial part	+ ^b
88	서양민들레	<i>Taraxacum officinale weber</i>	aerial part	- ^a
89	가자나무	<i>Terminalia chebula</i>	fruits	+ ^b
90	흑백나무	<i>Thuja orientalis</i>	aerial part	++ ^c
91	하늘타리	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	root	- ^a
92	하늘타리	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	fruits	- ^a
93	메역순나무	<i>Tripterygium regelii sprague</i>	leaf	- ^a
94	밀	<i>Triticum aestivum</i>	fruits	- ^a
95	느릅나무	<i>Ulmus davidiana var</i>	bark	- ^a
96	순비기나무	<i>Vitex rotundifolia Linne</i>	fruit	- ^a
97	포도	<i>Vitis vinifera</i>	seed	- ^a
98	대추나무	<i>Zizyphus jujuba var</i>	fruits	- ^a
99	산초나무	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	fruits	- ^a
100	도꼬마리	<i>Xanthium strumarium</i>	fruits	- ^a

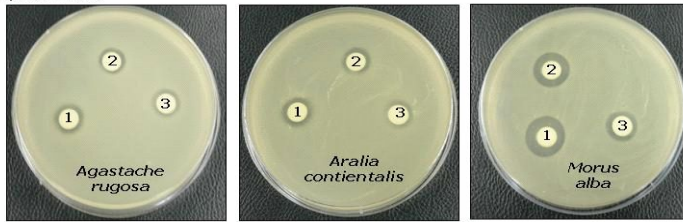
a) -: no inhibitory, b) +: <0.5mm, c) ++: <1mm

Table 3. Antibacterial activity of various plant extracts by paper disc diffusion test against *S. epidermidis*, *S. aureus* and *P. acnes*.

Medicinal plants	Inhibition Zone Diameter(mm)								
	<i>S. epidermidis</i> (mg/disc)			<i>S. aureus</i> (mg/disc)			<i>P. acnes</i> (mg/disc)		
	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125
<i>Agastache rugosa</i>	2,9	2,0	1,9	2,8	2,0	1,0	→	-	-
<i>Agrimonia pilosa</i>	1,9	3,1	-	5,5	4,8	2,9	4,9	4,1	3,8
<i>Aralia contidentialis</i>	2,9	2,1	1,1	-	-	-	4,2	2,0	-
<i>Artemisia capillaris</i>	2,0	1,0	0,9	-	-	-	-	-	-
<i>Ephedra sinica</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	4,0	3,8	2,0
<i>Evodia rutaecarpa</i>	1,0	1,0	-	-	-	-	4,1	2,9	1,8
<i>Juniperus chinensis</i>	3,0	2,0	-	-	-	-	5,8	4,0	4,0
<i>Morus alba</i>	5,9	5,0	2,0	6,8	4,0	3,8	4,9	4,8	4,0
<i>Plantago asiatica</i>	1,0	-	-	-	-	-	3,1	3,9	2,0
<i>Pyrola japonica</i>	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Reynoutria elliptica</i>	2,0	-	-	1,0	-	-	4,0	4,0	2,0
<i>Thuja orientalis</i>	2,0	2,0	-	-	-	-	3,0	2,0	-

a) -: no inhibitory

S.epidermidis



S.aureus



P.acnes

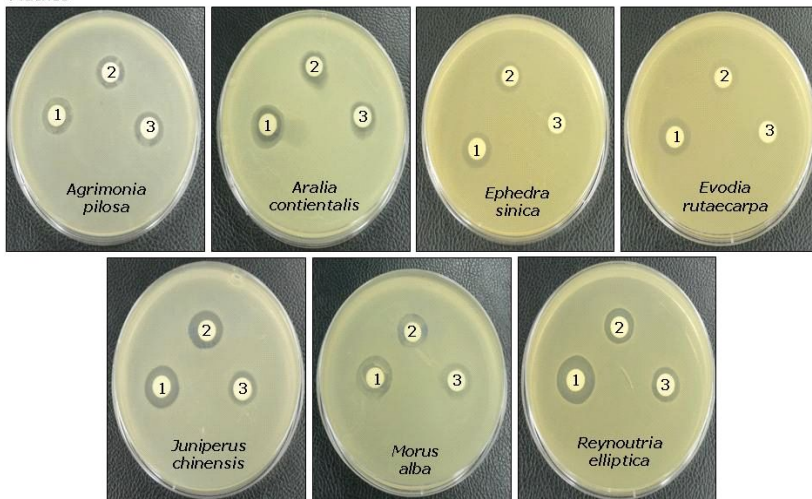


Fig. 2. Antibacterial activity of various plant extracts by paper disc diffusion test against *S. epidermidis*, *S. aureus* and *P. acnes*.

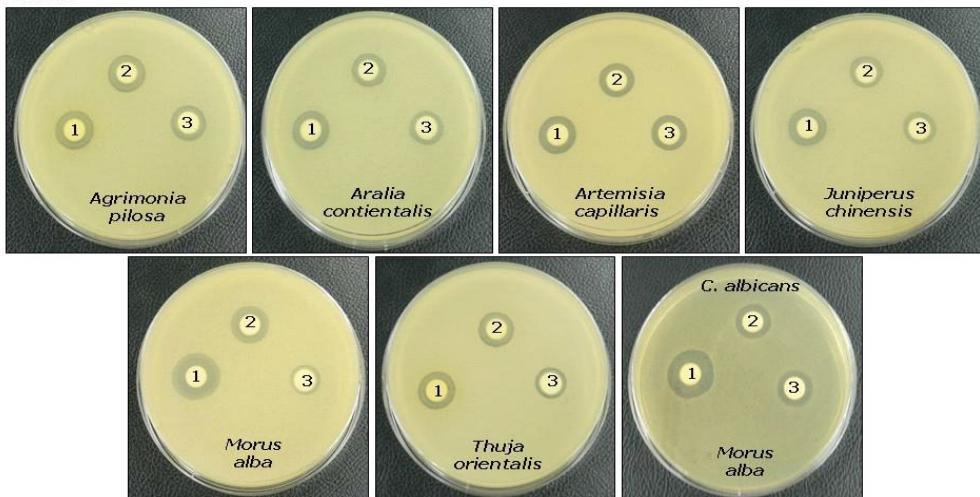
1: 0.5 mg/disc, 2: 0.25 mg/disc, 3: 0.125 mg/disc

Table 4. Antibacterial activity of various plant extracts by paper disc diffusion test against *P. ovale*, *M. furfur* and *C. albicans*

Medicinal plants	Inhibition Zone Diameter(mm)								
	<i>P. ovale</i> (mg/disc)			<i>M. furfur</i> (mg/disc)			<i>C. albicans</i> (mg/disc)		
	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125
<i>Agastache rugosa</i>	4,8	4,0	3,0	3,0	–	–	2,0	–	–
<i>Agrimonia pilosa</i>	3,8	3,5	3,5	3,0	–	–	–	–	–
<i>Aralia contidentialis</i>	4,0	2,8	2,0	4,9	3,0	–	–	–	–
<i>Artemisia capillaris</i>	4,0	3,5	2,0	2,0	–	–	–	–	–
<i>Ephedra sinica</i>	3,0	1,0	1,0	4,0	3,0	–	2,0	–	–
<i>Evodia rutaecarpa</i>	1,0	0,5	–	3,0	–	–	–	–	–
<i>Juniperus chinensis</i>	4,5	4,0	4,0	4,0	2,0	–	–	–	–
<i>Morus alba</i>	6,5	5,0	3,0	6,0	5,0	4,0	4,0	3,0	3,0
<i>Plantago asiatica</i>	1,2	1,0	0,5	3,8	–	–	–	–	–
<i>Pyrola japonica</i>	3,0	2,0	1,0	–	–	–	–	–	–
<i>Reynoutria elliptica</i>	2,8	2,0	1,0	5,0	2,0	–	–	–	–
<i>Thuja orientalis</i>	5,3	5,0	4,0	5,0	3,5	–	–	–	–

a) –: no inhibitory

P. ovale



M. furfur

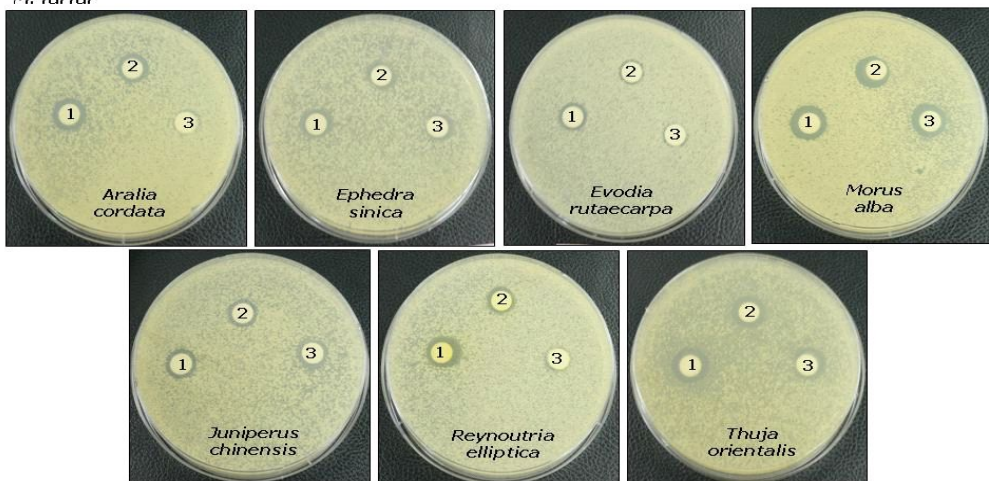


Fig. 3. Antibacterial activity of various plant extracts by paper disc diffusion test against *P. ovale*, *M. furfur* and *C. albicans*.

1: 0.5 mg/disc, 2: 0.25 mg/disc, 3: 0.125 mg/disc

1-3. 추출물의 미생물에 대한 최소 저해농도 (MIC) 측정

1차 선별된 12종 추출물에 대하여 최소 저해농도를 액체배지희석법 (broth dilution method)으로 측정한 결과를 Table 5에 표시되었다.

*S. epidermidis*에서는 *Agastache rugosa*가 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 생육이 저해 되었으며, *S. aureus*에서는 *Agrimonia pilosa*가 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 생육이 저해 되었다.

여드름 유발 원인균인 *P. acnes*에서는 *Agrimonia pilosa*, *Ephedra sinica*, *Morus alba*가 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 생육이 저해 되었다. 모낭 염 및 비듬원인균인 *P. ovale*에서는 *Agastache rugosa*, *Agrimonia pilosa*, *Artemisia capillaries*, *Morus alba*, *Thuja orientalis*가 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 생육이 저해 되었으며 *M. furfur*에서는 *Morus alba*가 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 생육이 저해 되었다. 무좀과 칸디다증의 원인균인 *C. albicans*에서는 *Morus alba*가 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 생육이 저해 되었다.

Table 5. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of various plant extracts against microorganisms

Medicinal plants	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	<i>S. epidemidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. ovale</i>	<i>M. furfur</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Agastache rugosa</i>	6,25	12,5	→)	3,1	25,0	25,0
<i>Agrimonia pilosa</i>	12,5	3,1	6,25	3,1	50,0	-
<i>Aralia contidentialis</i>	12,5	-	25,0	12,5	25,0	-
<i>Artemisia capillaris</i>	50,0	-	-	3,1	50,0	-
<i>Ephedra sinica</i>	12,5	50,0	6,25	6,25	-	20,0
<i>Evodia rutaecarpa</i>	25,0	-	12,5	25,0	50,0	-
<i>Juniperus chinensis</i>	25,0	-	12,5	3,1	25,0	-
<i>Morus alba</i>	12,5	6,25	6,25	3,1	6,25	3,1
<i>Plantago asiatica</i>	50,0	-	12,5	12,5	50,0	-
<i>Pyrola japonica</i>	50,0	-	-	6,25	-	-
<i>Reynoutria elliptica</i>	50,0	50,0	12,5	6,25	25,0	-
<i>Thuja orientalis</i>	12,5	-	25,0	3,1	25,0	-

a) Growth $50 \mu\text{g}/\text{ml}$

2. 추출물의 항산화 활성

2-1. 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

1차 선별된 12종의 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 tannic acid, naringin을 기준물질로 하여 측정하였다. 폴리페놀함량 측정결과 *Reynoutria elliptica*에서 209.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 높은 함량을 나타냈고, *Artemisia capillaris* 193.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Evodia rutaecarpa* 176.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Ephedra sinica* 175.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Plantago asiatica* 174.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Morus alba* 119.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Pyrola japonica* 107.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 등이 우수한 폴리페놀함량이 확인되었다 (Table 6.).

플라보노이드 함량은 *Artemisia capillaries*에서 138.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 높은 함량을 나타냈고, *Plantago asiatica* 130.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Agastache rugosa* 87.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Reynoutria elliptica* 83.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Evodia rutaecarpa* 73.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Morus alba* 68.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Juniperus chinensis* 66.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Ephedra sinica* 56.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 등에서 비교적 높은 플라보노이드 함량이 확인되었다 (Table 6.).

Table 6. Polyphenolics and flavonoids contents in various plant extracts.

Sample	Total phenolics ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Total flavonoids ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Agastache rugosa</i>	61,2 \pm 1,76	50,32 \pm 3,5
<i>Agrimonia pilosa</i>	91,5 \pm 3	32,77 \pm 3,77
<i>Aralia contidentialis</i>	6,53 \pm 2,18	8,47 \pm 1,3
<i>Artemisia capillaris</i>	193,2 \pm 1,23	138,21 \pm 3
<i>Ephedra sinica</i>	175,5 \pm 0,66	56,91 \pm 2,15
<i>Evodia rutaecarpa</i>	176,6 \pm 0,01	73,7 \pm 0,02
<i>Juniperus chinensis</i>	84,9 \pm 0,01	66,4 \pm 0,02
<i>Morus alba</i>	119,5 \pm 5,23	68,99 \pm 3,61
<i>Plantago asiatica</i>	174,0 \pm 0,01	130,9 \pm 0,05
<i>Pyrola japonica</i>	107,5 \pm 0,03	50 \pm 0,01
<i>Reynoutria elliptica</i>	209,1 \pm 0,02	83,4 \pm 0,02
<i>Thuja orientalis</i>	49,2 \pm 4,35	50,32 \pm 3,5

2-2. 추출물의 DPPH 라디컬 소거활성

1차 선발된 12종의 추출물에 대하여 천연항산화제로서의 이용 가능성을 확인하기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 *Ephedra sinica* 27.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Reynoutria elliptica* 39.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Evodia rutaecarpa* 49.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Agrimonia pilosa* 58.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Artemisia capillaries* 86.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로, 합성 항산화제 BHT의 105.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 우수한 소거능이 나타났다 (Table 7). 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 *Reynoutria elliptica*, *Evodia rutaecarpa*, *Plantago asiatica*, *Ephedra sinica* 이 vitamin C 와 유사한 90%의 효과가 나타났다 (Fig. 4.).

Table. 7. DPPH radical scavenging activity of various plant extracts.

Sample	IC ₅₀ (µg/ml) ^{a)}	Sample	IC ₅₀ (µg/ml) ^{a)}
<i>Agastache rugosa</i>	400<	<i>Morus alba</i>	257±0.91
<i>Agrimonia pilosa</i>	58.41±0.26	<i>Plantago asiatica</i>	170.47±1.12
<i>Aralia contidentialis</i>	400<	<i>pyrola japonicaP</i>	170.1±1.23
<i>Artemisia capillaris</i>	86.43±0.73	<i>Reynoutria elliptica</i>	39.14±2.14
<i>Ephedra sinica</i>	27.51±0.57	<i>Thuja orientalis</i>	358.8±0.67
<i>Evodia rutaecarpa</i>	49.17±0.26	BHT	105.1±0.50
<i>Juniperus chinensis</i>	153.80±0.49	Vitamin C	9.08±1.20

a) IC₅₀: Inhibitory activity is expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determination. The values are obtained by interpolation of concentration-inhibition curve

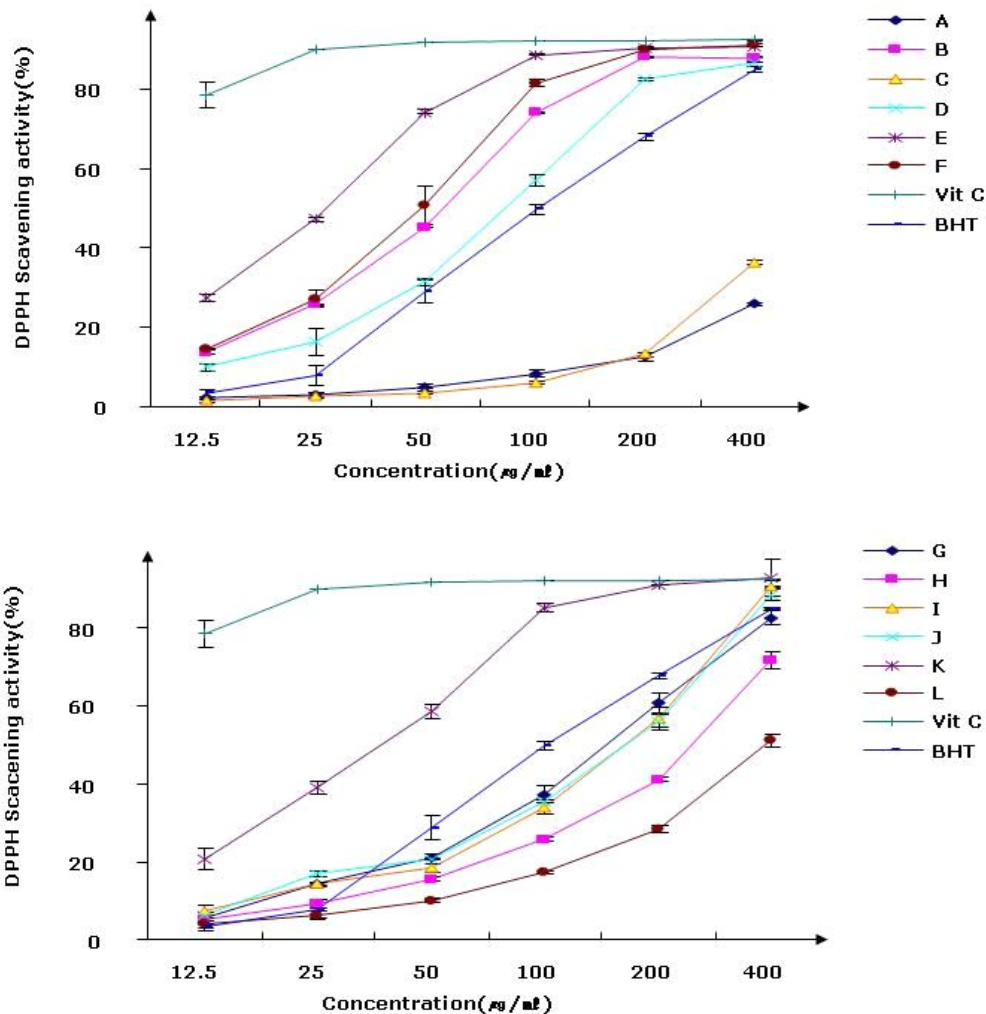


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of various plant extracts compared with Vitamin C and BHT. DPPH free radical scavenging activities of extracts in various concentrations were measured using spectrophotometric methods. A: *Agastache rugosa*, B: *Agrimonia pilosa*, C: *Aralia contientalis*, D: *Artemisia capillaris*, E: *Ephedra sinica*, F: *Evodia rutaecarpa* G: *Juniperus chinensis*, H: *Morus alba*, I: *Plantago asiatica*, J: *Pyrola japonica*, K: *Reynoutria elliptica*, L: *huja orientalis*

2-3. 추출물의 아질산염 소거능

1차 선발된 12종의 추출물에 pH 1.2의 조건에서 농도에 따라 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 측정된 결과는 Fig. 5 와 같다. 12종의 추출물에서 아질산염 분해능을 나타내었고, 결과는 농도 의존적이었다. 농도가 증가하면서 분해능도 높게 나타났다. 12종의 추출물 중에서 *Evodia rutaecarpa*, *Ephedra sinica*, *Reynoutria elliptica* 순으로 우수한 활성을 나타내었으며, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 68.75%, 68.37%, 55.67%의 아질산염 소거능을 보였다.

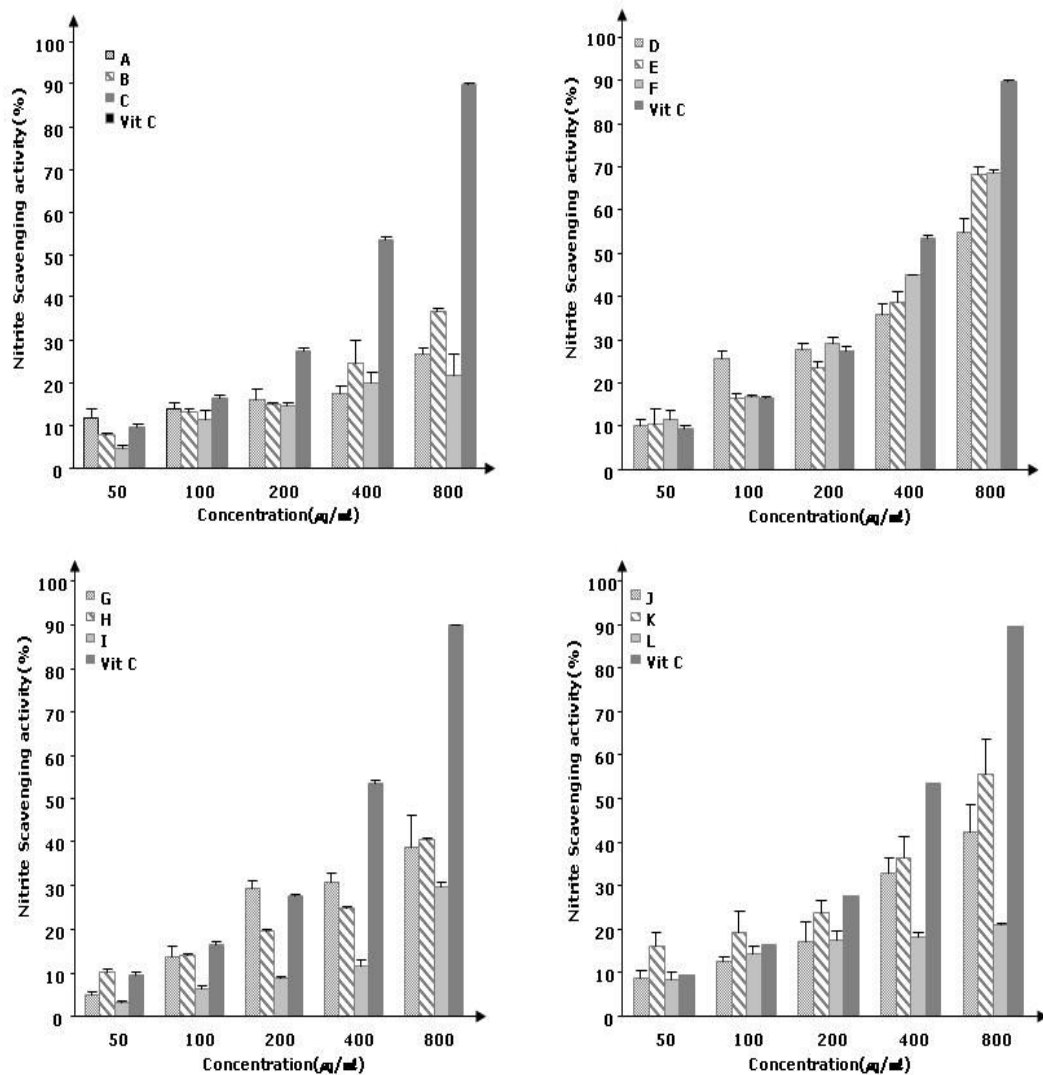


Fig. 5. Nitrite scavenging activity of various plant extracts. Extract was incubated with 2ml of 2 mM sodium nitrite at 37°C at pH 1.2. A: *Agastache rugosa*, B: *Agrimonia pilosa*, C: *Aralia contientalis*, D: *Artemisia capillaris*, E: *Ephedra sinica*, F: *Evodia rutaecarpa* G: *Juniperus chinensis*, H: *Morus alba*, I: *Plantago asiatica*, J: *Pyrola japonica*, K: *Reynoutria elliptica*, L: *Thuja orientalis*

2-4. 추출물의 HaCaT 세포에 대한 생존율

1차 선발된 12종의 추출물이 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시료를 농도 별로 처리하여 MTT assay를 실시하였다. 그 결과 시료의 처리 농도 의존적으로 세포 독성이 더 강해지는 것을 관찰하였으며, 각 시료별 세포 생존율을 80% 이상인 농도를 정하여 다음 실험에 적용하였다 (Fig. 6-a, b, c, Table 8).

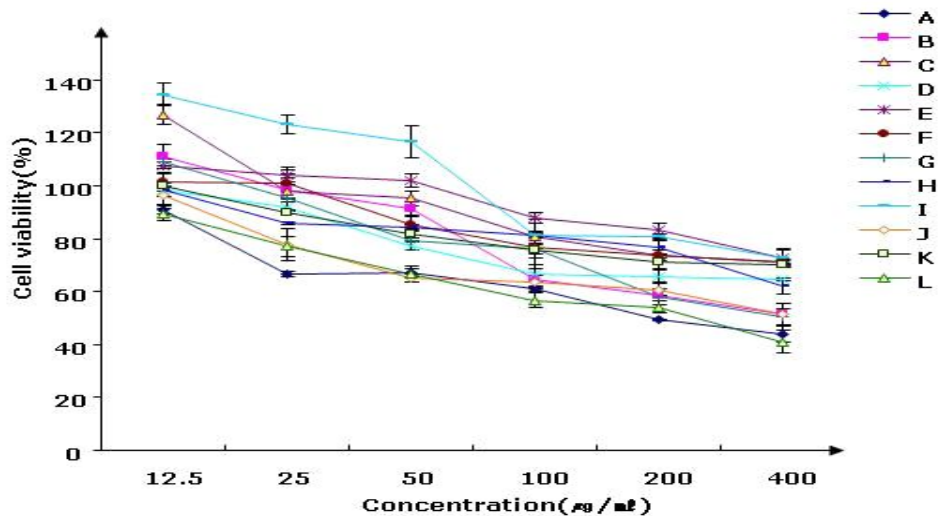


Fig. 6-a. Effects of various plant extracts on HaCaT cells viability. Cells were treated with indicated concentrations of various extracts for 24hrs. Cell viabilities were measured using MTT assay. The viability of untreated control cells were defined as 100%. Results are shown as mean \pm SD (n=3). A:*Agastache rugosa*, B:*Agrimonia pilosa*, C:*Aralia contientalis*, D:*Artemisia capillaris*, E:*Ephedra sinica*, F:*Evodia rutaecarpa* G:*Juniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I:*Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K:*Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

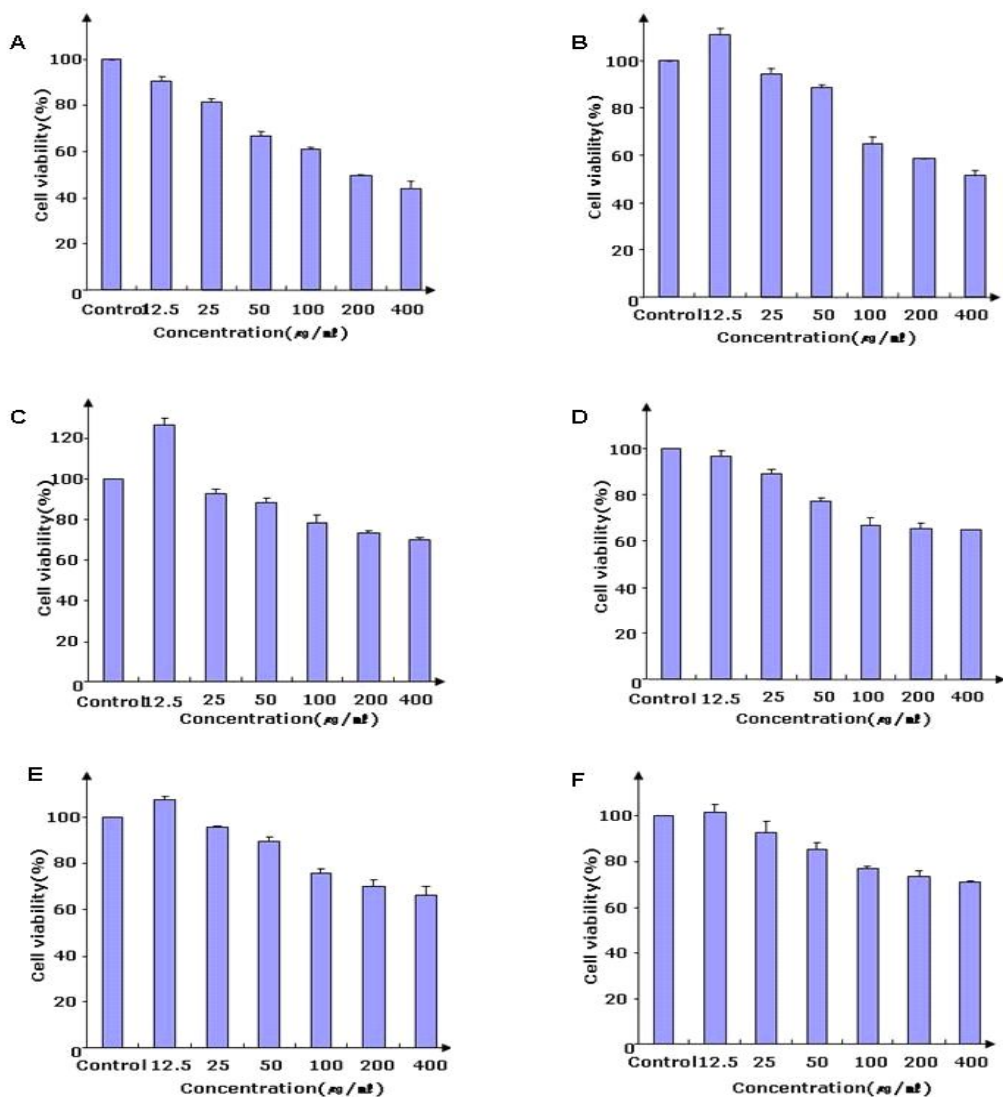


Fig. 6-b. Effect of various plant extracts on HaCaT cells viability. Cells were treated with indicated concentrations of various extracts for 24hrs. Cell viabilities were measured using MTT assay. The viability of untreated control cells was defined as 100%. Results are show as mean \pm SD(n=3). A: *Agastache rugosa*, B: *Agrimonia pilosa*, C: *Aralia contientalis*, D: *Artemisia capillaris*, E: *Ephedra sinica*, F: *Evodia rutaecarpa*

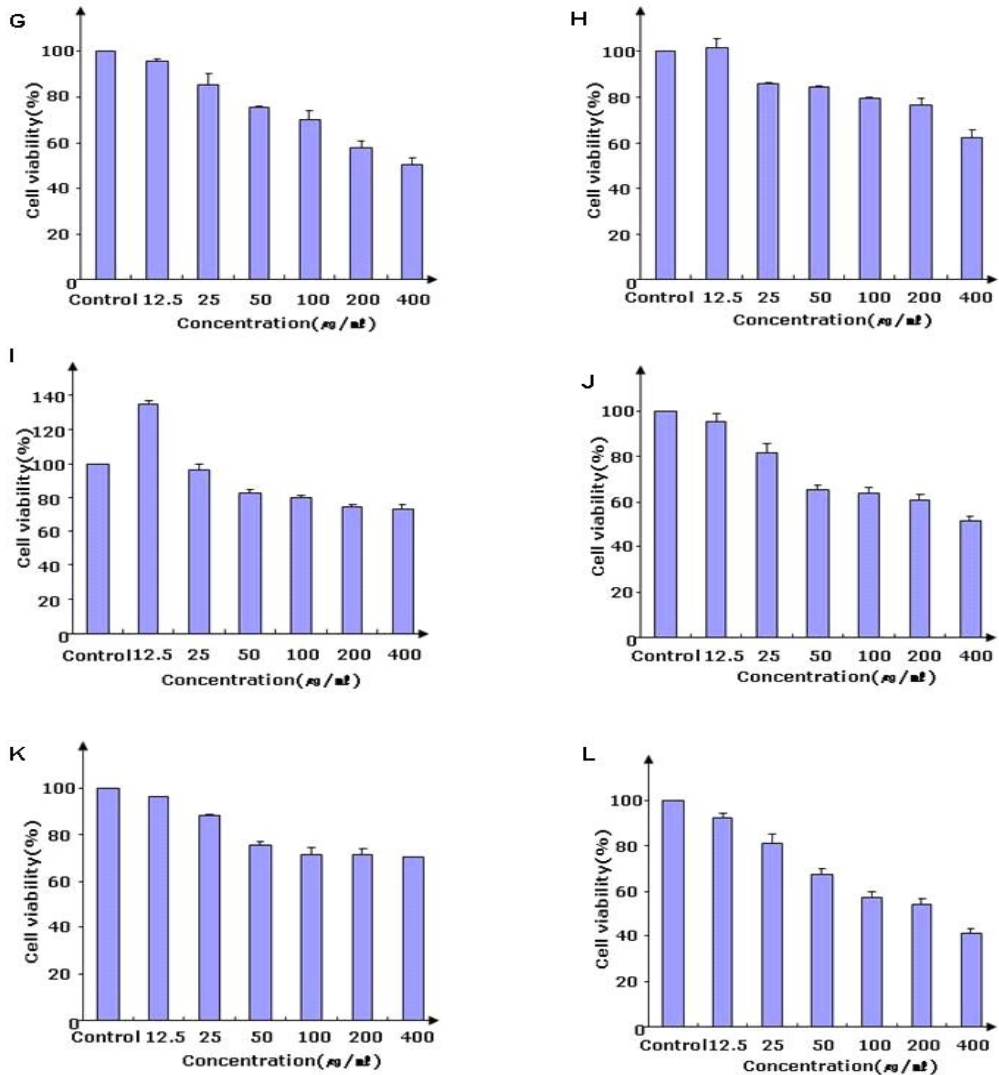


Fig. 6-c. Effect of various plant extracts on HaCaT cells viability. Cells were treated with indicated concentrations of various extracts for 24hrs. Cell viabilities were measured using MTT assay. The viability of untreated control cells was defined as 100%. Results are shown as mean \pm SD(n=3).G:*Juniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I:*Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K:*Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

Table 8. Effect of various plant extracts on HaCaT cells viability.

Samps	Concentration($\mu\text{g/ml}$)					
	12.5	25	50	100	200	400
<i>Agastache rugosa</i>	90.76 \pm 1.6	81.56 \pm 1.1	67.06 \pm 1.4	60.91 \pm 0.9	49.24 \pm 0.4	44.00 \pm 3.1
<i>Agrimonia pilosa</i>	111.01 \pm 4.7	94.17 \pm 4.6	88.32 \pm 2.6	64.79 \pm 3.7	58.42 \pm 0.1	51.27 \pm 4.2
<i>Aralia contientalis</i>	126.76 \pm 3. 8	97.98 \pm 3.2	88.25 \pm 2.8	78.814 \pm 3. 5	73.46 \pm 0.5	71.23 \pm 0.7
<i>Artemisia capillaris</i>	96.51 \pm 2.5	89.03 \pm 1.9	77.38 \pm 1.6	66.75 \pm 3.3	65.70 \pm 2.1	64.63 \pm 0.3
<i>Ephedra sinica</i>	107.62 \pm 1.2	95.77 \pm 0.6	89.10 \pm 2.4	75.79 \pm 1.9	70.19 \pm 2.7	66.61 \pm 3.3
<i>Evodia rutaecarpa</i>	101.46 \pm 3.3	92.99 \pm 4.8	85.52 \pm 2.9	76.80 \pm 0.7	73.67 \pm 2.1	70.97 \pm 0.8
<i>Juniperus chinensis</i>	95.77 \pm 1.1	85.54 \pm 4.5	75.45 \pm 0.7	70.21 \pm 3.9	57.86 \pm 3.0	50.27 \pm 3.0
<i>Morus alba</i>	101.63 \pm 5.9	85.93 \pm 0.5	84.51 \pm 0.5	79.23 \pm 0.5	76.56 \pm 2.6	62.06 \pm 3.1
<i>Plantago asiatica</i>	134.4 \pm 2.2	96.20 \pm 3.3	82.52 \pm 2.2	78.49 \pm 1.3	74.61 \pm 1.0	68.58 \pm 3.2
<i>Pyrola japonica</i>	95.28 \pm 3.3	81.72 \pm 3.9	65.16 \pm 1.5	63.84 \pm 2.6	60.75 \pm 2.2	51.37 \pm 2.0
<i>Reynoutria elliptica</i>	95.87 \pm 0.2	88.01 \pm 0.6	75.61 \pm 1.4	71.61 \pm 2.8	68.18 \pm 2.5	60.05 \pm 0.3
<i>Thuja orientalis</i>	92.26 \pm 0.2	81.14 \pm 3.8	66.71 \pm 2.9	56.66 \pm 2.8	54.07 \pm 2.2	41.10 \pm 2.3

2-5. 추출물의 HaCaT 세포내 ROS 제거능 평가

1차 선발된 12종의 추출물이 H₂O₂로 자극된 HaCaT 세포에서 ROS 제거능을 측정한 결과 12종의 추출물 중 20, 50 µg/ml 농도에서 *Agrimonia pilosa*은 각각 55.99%, 47.06%으로, *Evodia rutaecarpa*는 각각 61.07%, 42.46%으로, *Ephedra sinica*이 각각 76.23%, 74.09%로 ROS가 제거되었다. 추출물은 처리농도 의존적으로 ROS 제거 효능이 확인되었다 (Fig. 7-a, b).

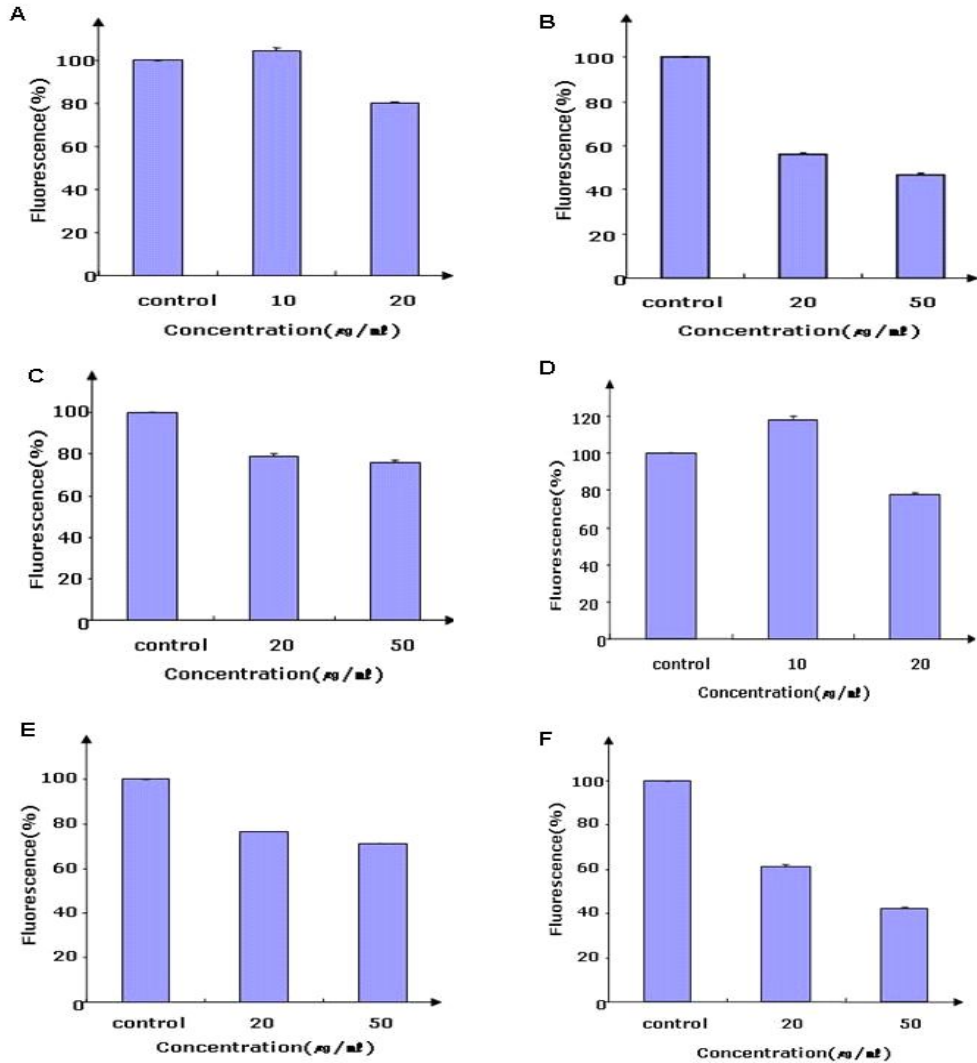


Fig. 7-a. Inhibitory effect of various plant extracts on ROS production in HaCaT cells stimulated by H₂O₂. A: *Agastache rugosa*, B: *Agrimonia pilosa*, C: *Aralia contientalis*, D: *Artemisia capillaris*, E: *Ephedra sinica*, F: *Evodia rutaecarpa*

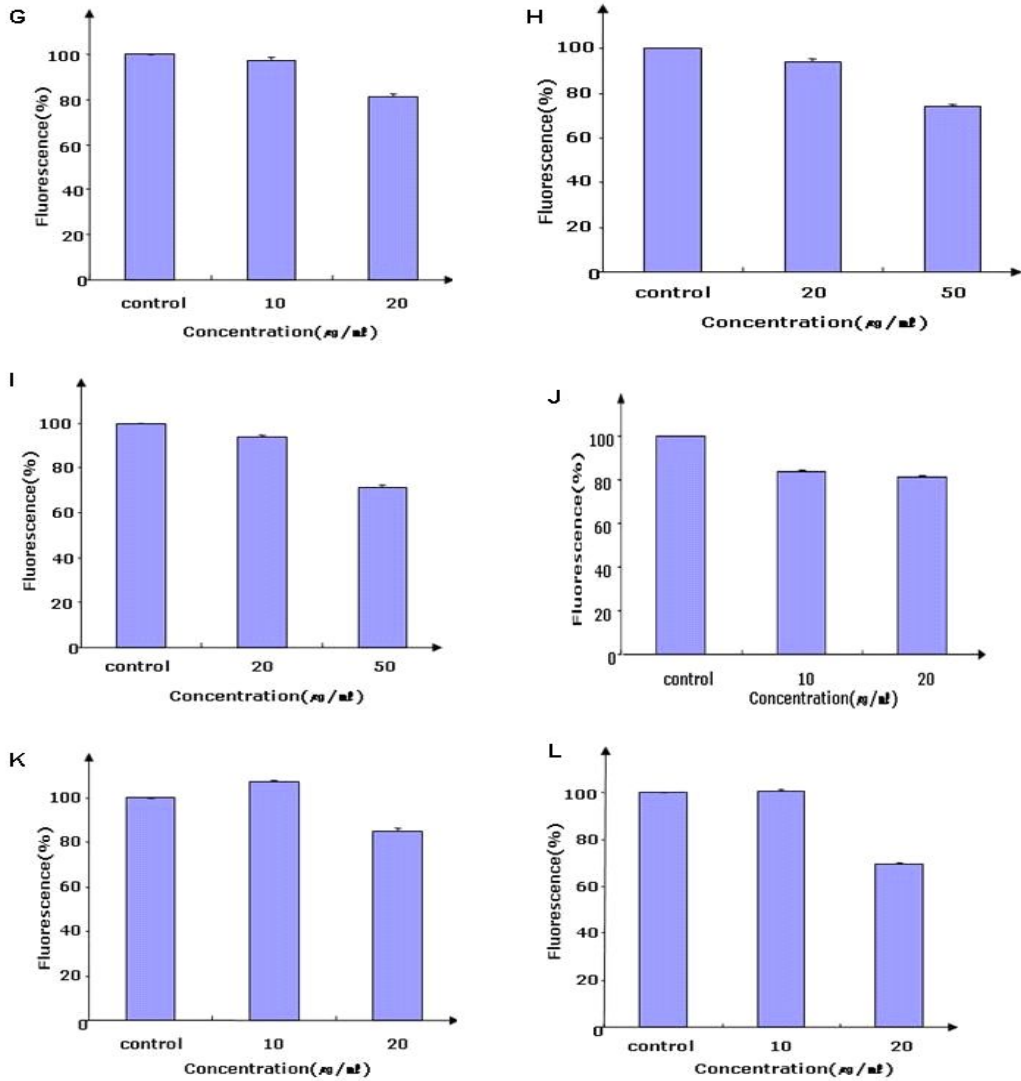


Fig. 7-b. Inhibitory effect of various plant extracts on ROS production in HaCaT cells stimulated by H₂O₂. G: *Juniperus chinensis*, H: *Morus alba*, I: *Plantago asiatica*, J: *Pyrola japonica*, K: *Reynoutria elliptica*, L: *Thuja orientalis*

3. 추출물의 HaCaT세포 보호효과

3-1. 산화물질에 대한 HaCaT 세포의 생존율

3-1-1. H₂O₂ 농도차이에 따른 세포생존율

H₂O₂ 가 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 50, 250, 500 μM의 H₂O₂를 처리하고 24시간 배양 후 MTT assay에 의하여 세포 생존율을 조사하였다. 50, 250, 500 μM 농도처리에서는 대조군과 비교하여 각각 88.5%, 78.1%, 40.5% 으로 감소하였다 (Table 9-a).

3-1-2. Rotenone 농도차이에 따른 세포생존율

Rotenone이 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1.25~10 μM 의 각각 농도가 포함된 rotenone의 배양액에서 24시간 동안 배양한 후 MTT assay에 의하여 세포생존율을 조사하였다. 농도에 의존적으로 유의하게 감소되었다 (Table 9-b).

3-1-3. Paraquat 농도차이에 따른 세포생존율

Paraquat가 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 250~1000 μM 의 각각 농도로 포함된 paraquat의 배양액에서 24시간 동안 배양한 후 MTT assay에 의하여 세포 생존율을 조사하였다. 250 μM 처리에서는 대조군 100%에 비하여 84.17%이었으며 500 μM의 처리에서는 세포생존율이 49.78%이었다. 1000 μM의 처리에서는 38.5%의 세포생존율을 나타냈다 (Table 9-c).

Table 9-a. Cytotoxic effects of H₂O₂ on HaCaT cells .

H ₂ O ₂ (μM)	MTT assay (540nm)	
	Absorbance	Cell viability (% of control)
Control	0.995± 0.03	100
50	0.875± 0.5	88.5±1.21
250	0.777±0.78	78.1±2.49
500	0.403±0.40	40.5±7.79

Table 9-b. Cytotoxic effects of rotenone on HaCaT cells.

Rotenone (μM)	MTT assay (540nm)	
	Absorbance	Cell viability (% of control)
Control	1.054±0.01	100
1.25	0.546±0.32	51.8±3.50
2.5	0.45±0.26	42.7±1.12
5	0.391±0.12	37.1±0.47
10	0.332±0.00	31.5±1.15

Table 9-c. Cytotoxic effects of paraquat on HaCaT cells.

Paraquat (μM)	MTT assay (540nm)	
	Absorbance	Cell viability (% of control)
Control	1.025±0.03	100
250	0.863±0.04	84.17±3.68
500	0.51±0.06	49.78±5.84
1000	0.392±0.01	38.5±1.5

3-2. 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과

3-2-1. H₂O₂ 에 의한 유발된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과

1차 선별된 12종의 추출물이 H₂O₂ 에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과를 확인하기 위하여 24시간 동안 배양한 후 세포생존율 농도에 따라 2시간 동안 전처리하고, 500 μM의 H₂O₂ 를 후 처리한 다음 24시간 후에 보호효과를 측정하였다.

그 결과, 대조군의 세포생존율을 100%로 보았을 때 전 처리하지 않는 실험군은 39.5% 세포생존율을 나타낸 반면, 12종의 추출물 중 20, 50 μg/ml 전처리에 서는 *Ephedra sinica*은 실험군에 비해서 각각 25%, 50%의 보호효과 *Aralia cordata*은 10%, 20%의 보호효과 *Plantago asiatica*는 10%, 16%의 보호효과가 증대되었다 (Fig. 8-a, b).

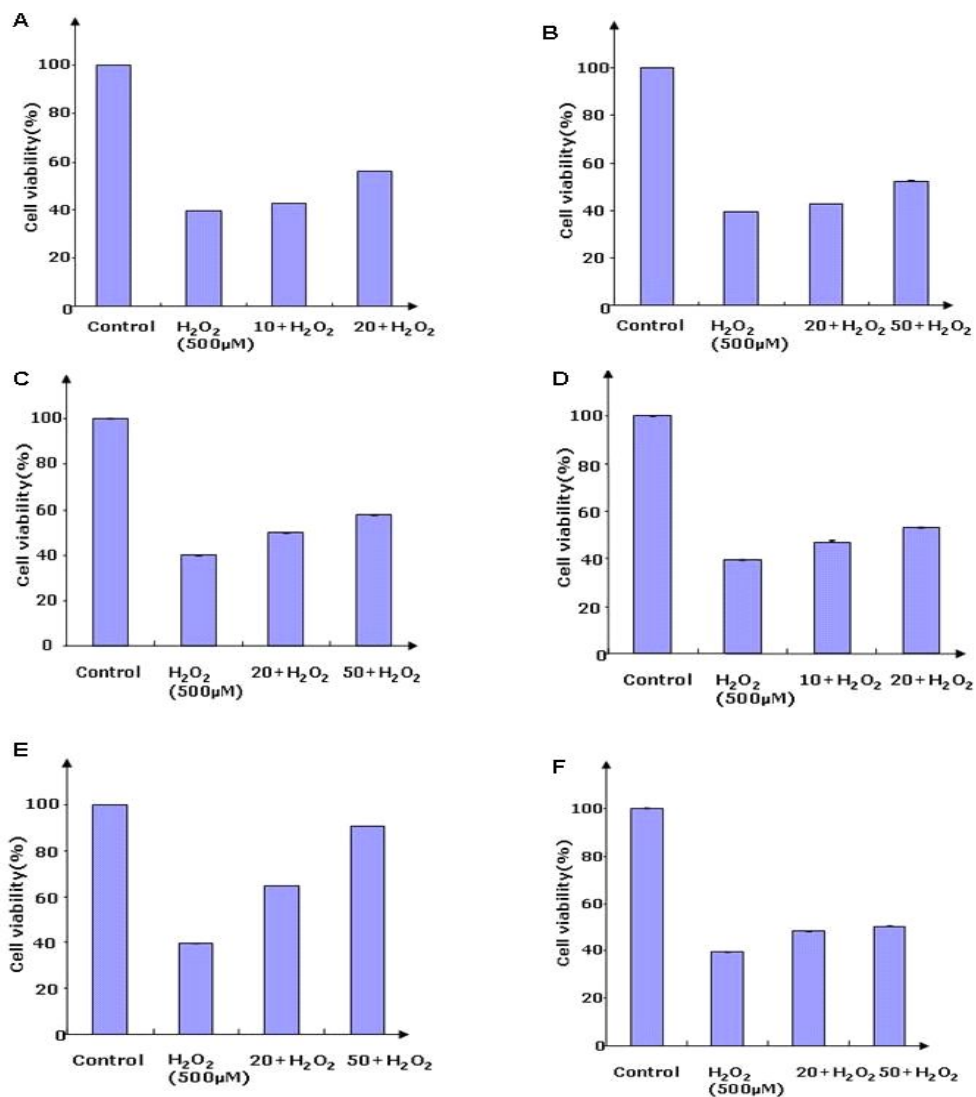


Fig. 8-a. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by H₂O₂ in human HaCaT cells. Protective effect of plant extracts against oxidative stress induced by H₂O₂ were measured using MTT method. Cells were incubated with plant extracts for 2hr followed by treatment with 500 µM H₂O₂ for 24hr. A : *Agastache rugosa*, B : *Agrimonia pilosa*, C : *Aralia contidentialis*, D : *Artemisia capillaris*

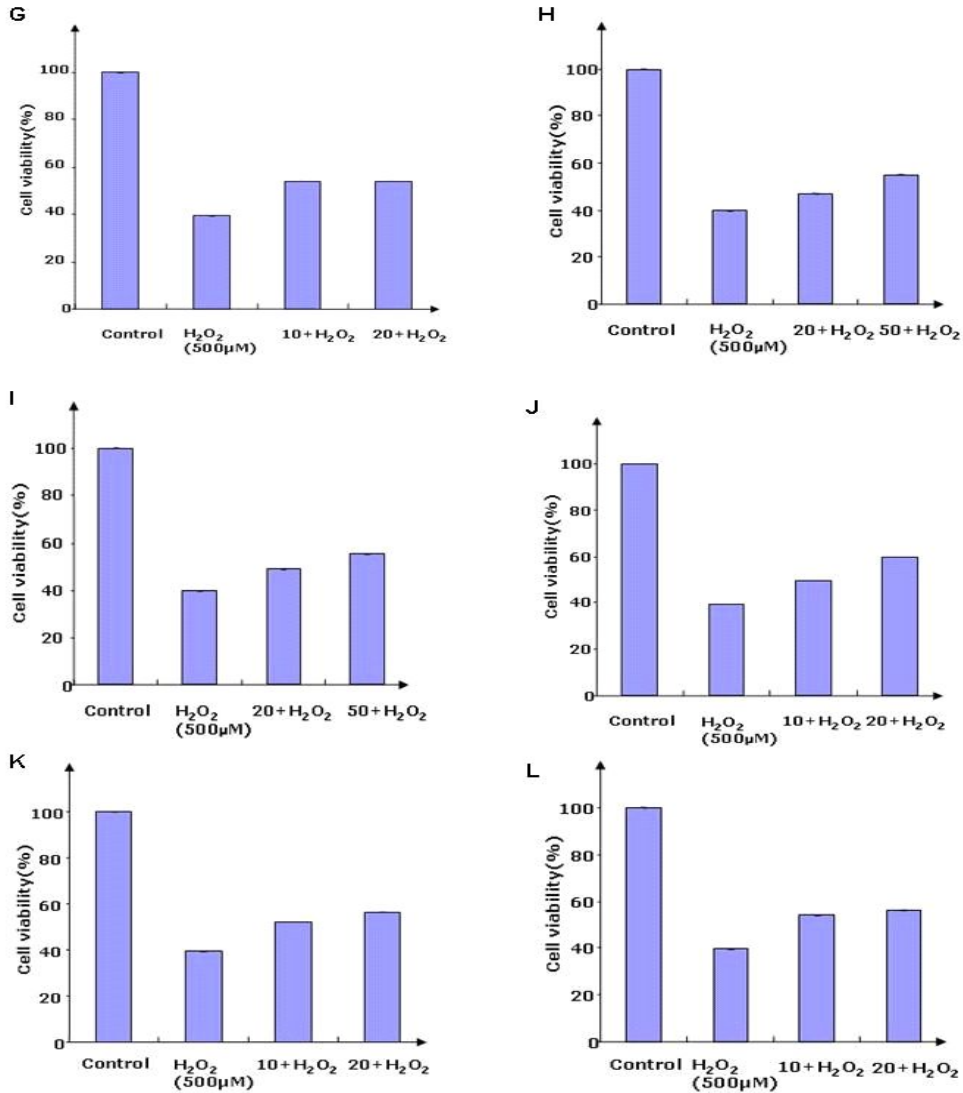


Fig. 8-b. Protective effect of plant extracts against oxidative stress induced by H₂O₂ in human HaCaT cells. Protective effect of plant extracts against oxidative stress induced by H₂O₂ were measured using MTT method. Cells were incubated with plant extracts for 2hr followed by treatment with 500 µM H₂O₂ for 24hr. G: *Juniperus chinensis*. H: *Morus alba*, I: *Plantago asiatica*, J: *Pyrola japonica*, K : *Reynoutria elliptica*, L: *Thuja orientalis*

3-2-2. Rotenone 에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과

1차 선별된 12종 추출물이 rotenone 에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호 효과를 확인하기 HaCaT 세포를 24시간 동안 배양한 후 세포생존율 농도에 따라 12종의 추출물을 2시간 동안 전처리하고, 1.25 μ M rotenone를 후 처리한 다음 24시간 후에 세포 보호효과를 확인하였다.

그 결과, 대조군의 세포생존율을 100%로 보았을 때 전 처리하지 않는 실험군은 55.18%이하의 세포생존율을 나타낸 반면, 12종의 추출물 중 20, 50 μ g/ml 전처리에서는 *Ephedra sinica*은 각각 실험군에 비해서 17%, 45%의 보호효과 *Morus alba*는 30%, 35%의 보호효과 *Plantago asiatica*는 9%, 16%의 보호효과가 증대 되었다 (Fig. 9-a, b).

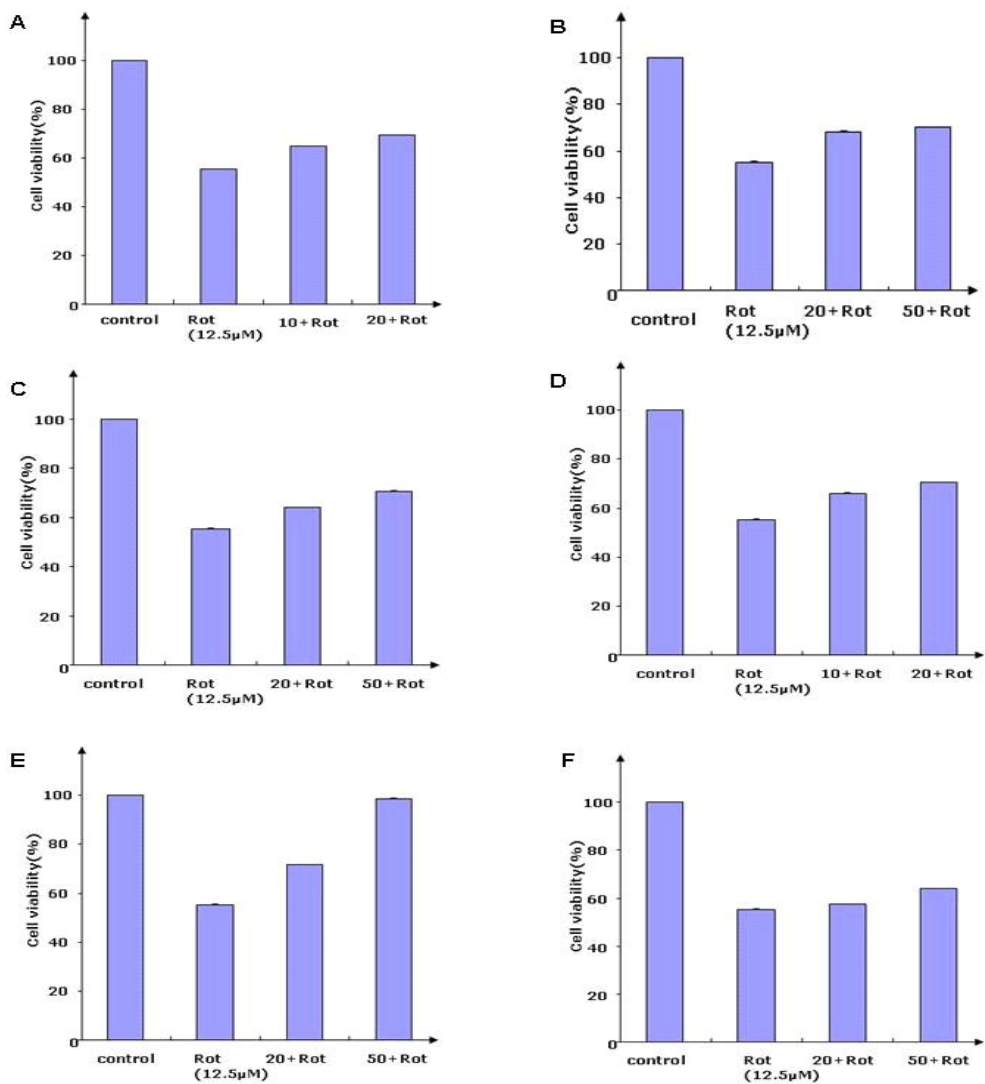


Fig. 9-a. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by rotenone in human HaCaT cells. Protective effect of plant extracts against oxidative stress induced by rotenone were measured using MTT method. Cells were incubated with plant extracts for 2hr followed treatment with 1.25 μM rotenone for 24hr. Rot: Rotenone, A: *Agastache rugosa*, B: *Agrimonia pilosa*, C: *Aralia contientalis*, D: *Artemisia capillaris*, E: *Ephedra sinica*, F: *Evodia rutaecarpa*.

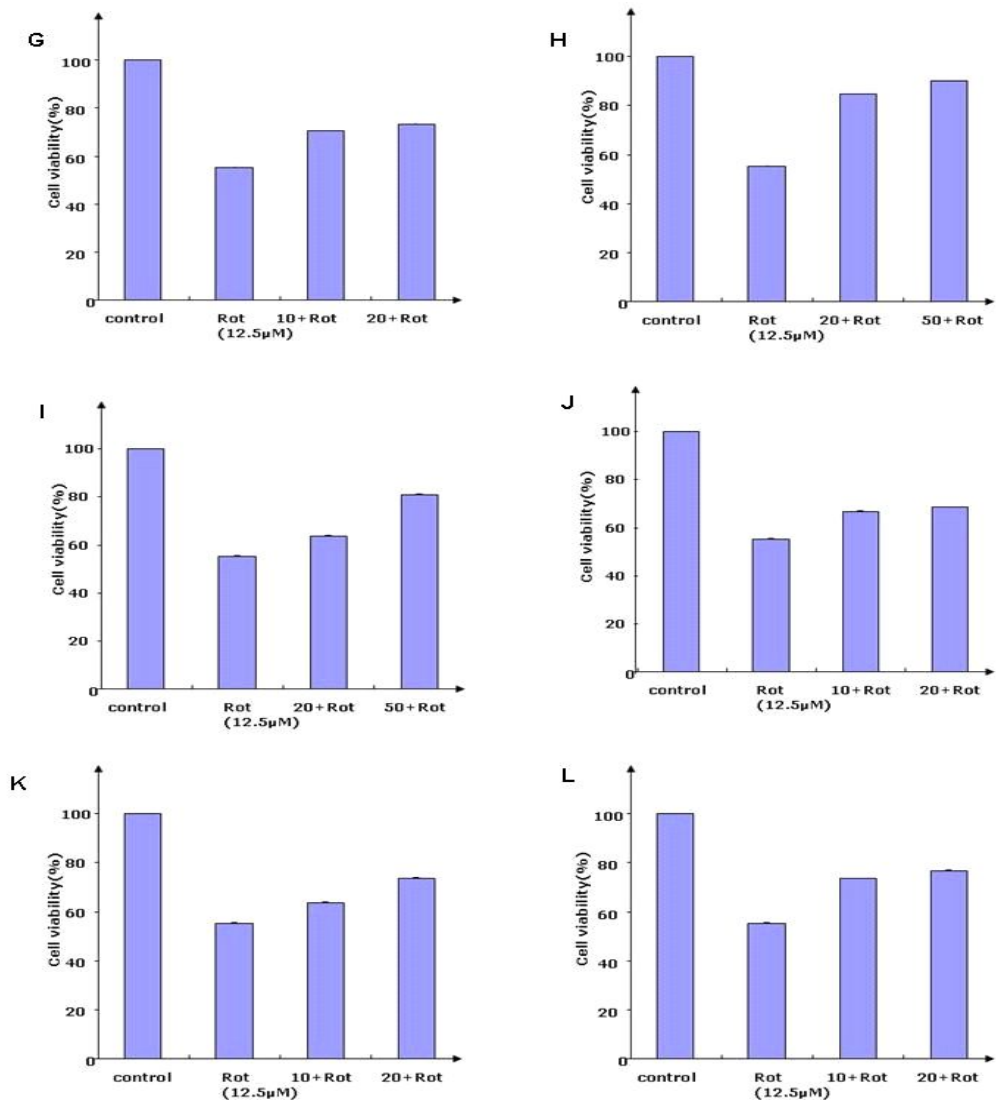


Fig. 9-b. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by rotenone in human HaCaT cells. Protective effect of plant extracts against oxidative stress induced by rotenone were measured using MTT method. Cells were incubated with plant extracts for 2hr followed treatment with 1.25 μ M rotenone for 24hr. Rot:Rotenone, G :*Juniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I:*Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K:*Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

3-2-3. Paraquat 에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과

1차 선별된 12종의 추출물이 paraquat에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과를 확인하기 위하여 24시간 동안 배양한 후 세포생존율 농도에 따라 12종의 추출물을 2시간 동안 전처리하고, 500 μM paraquat를 후 처리한 다음 24시간 후에 보호효과를 확인 하였다.

그 결과, 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 전 처리하지 않는 실험군은 48.14%이하의 세포생존율을 나타낸 반면, 12종 추출물 중 *Ephedra sinica*은 20, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 전처리에서 실험군에 비해서 4%, 7%의 보호효과가 증대되었고, *Reynoutria elliptica*은 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 전처리에서는 대조군에 비해서 3%, 9%의 보호효과가 증대되었다. *Artemisia capillaris*은 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 전처리에서는 6%, 7%의 보호효과가 증대 되었다 (Fig. 10-a, b).

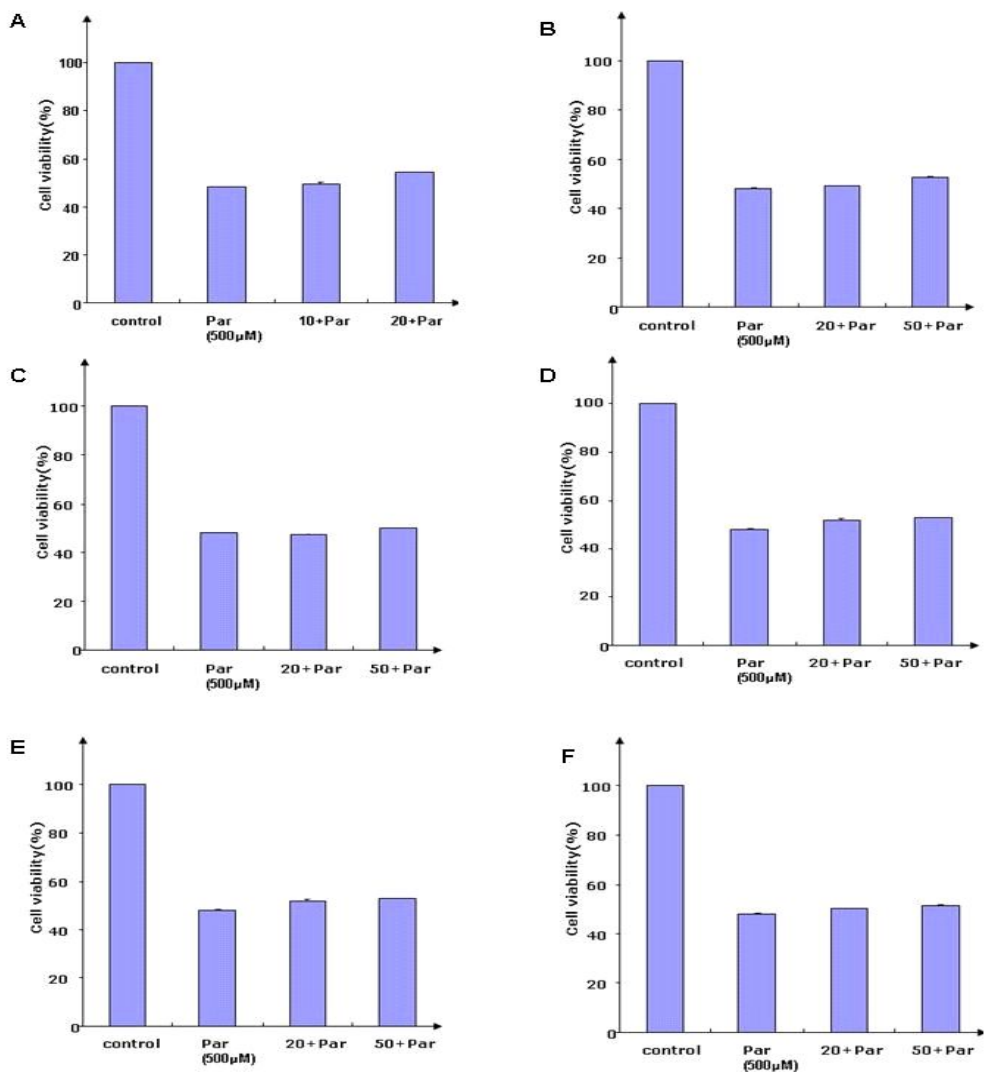


Fig. 10-a. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by paraquat in human HaCaT cells. Protective effect of plant extracts against oxidative stress induced by paraquat were measured using MTT method. Cells were incubated with plant extracts for 2hr followed by treatment with 500 μ M paraquat for 24hr. Par: paraquat, A:*Agastache rugosa*, B:*Agrimonia pilosa*, C:*Aralia contientalis*, D:*Artemisia capillaris*, E:*Ephedra sinica*, F:*Evodia rutaecarpa*

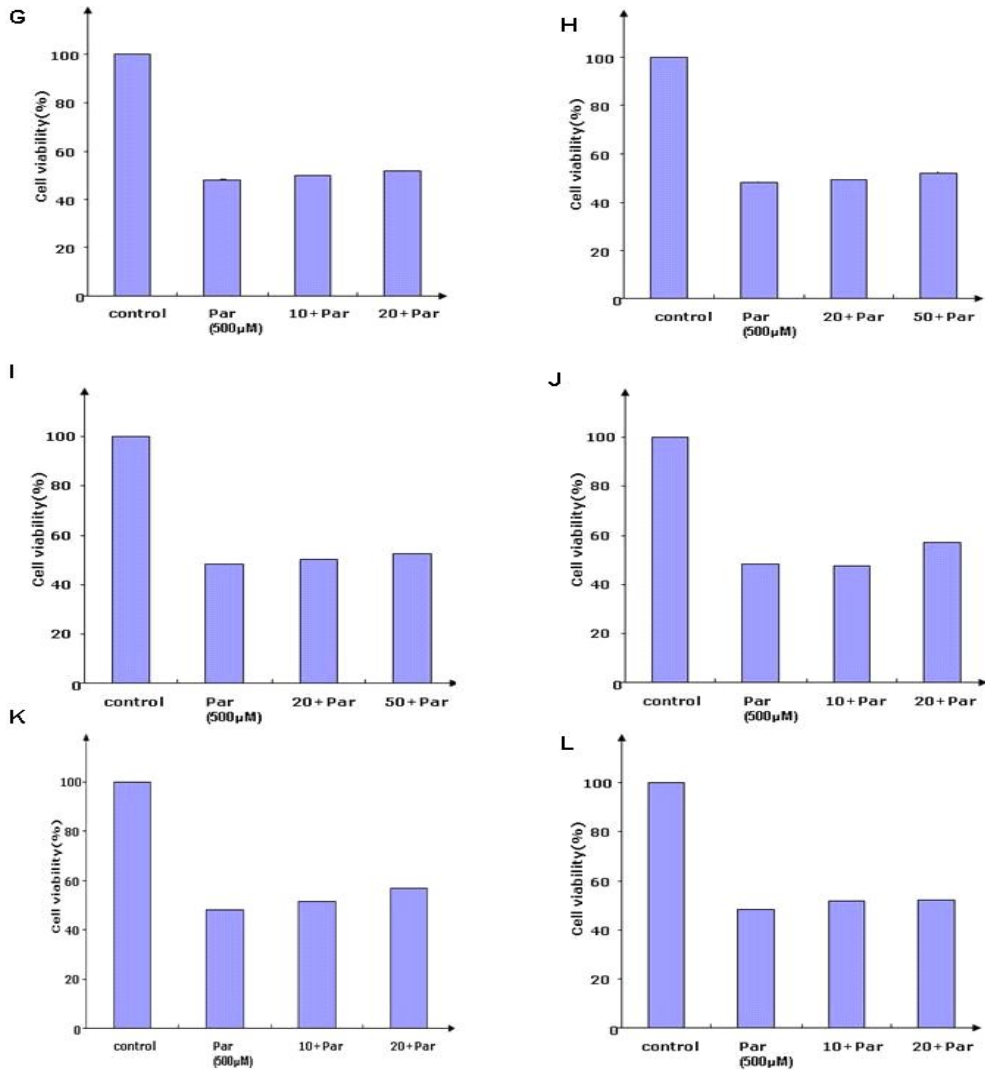


Fig. 10-b. Protective effect of various plant extracts against oxidative stress induced by paraquat in human HaCaT cells. Protective effect of plant extracts against oxidative stress induced by paraquat were measured using MTT method. Cells were incubated with plant extracts for 2hr followed by treatment with 500 μM paraquat for 24hr. Par:paraquat, G:*Juniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I:*Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K: *Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

4. 추출물의 미백활성

4-1. *in vitro* tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제할 수 있는 물질은 피부의 melanin 생성을 억제할 수 있기 때문에 피부미백을 목표로 하는 기능성 화장품의 첨가제로 이용할 수 있다. 1차 선별된 12종의 추출물을 이용하여 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 11 과 같다. 각 추출물의 농도를 25~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 결과 12종의 추출물에서 농도 의존적으로 활성 억제효과가 있었으며, *Morus alba*, *Ephedra sinica*, *Reynoutria elliptica* 등이 우수한 억제율을 보였다.

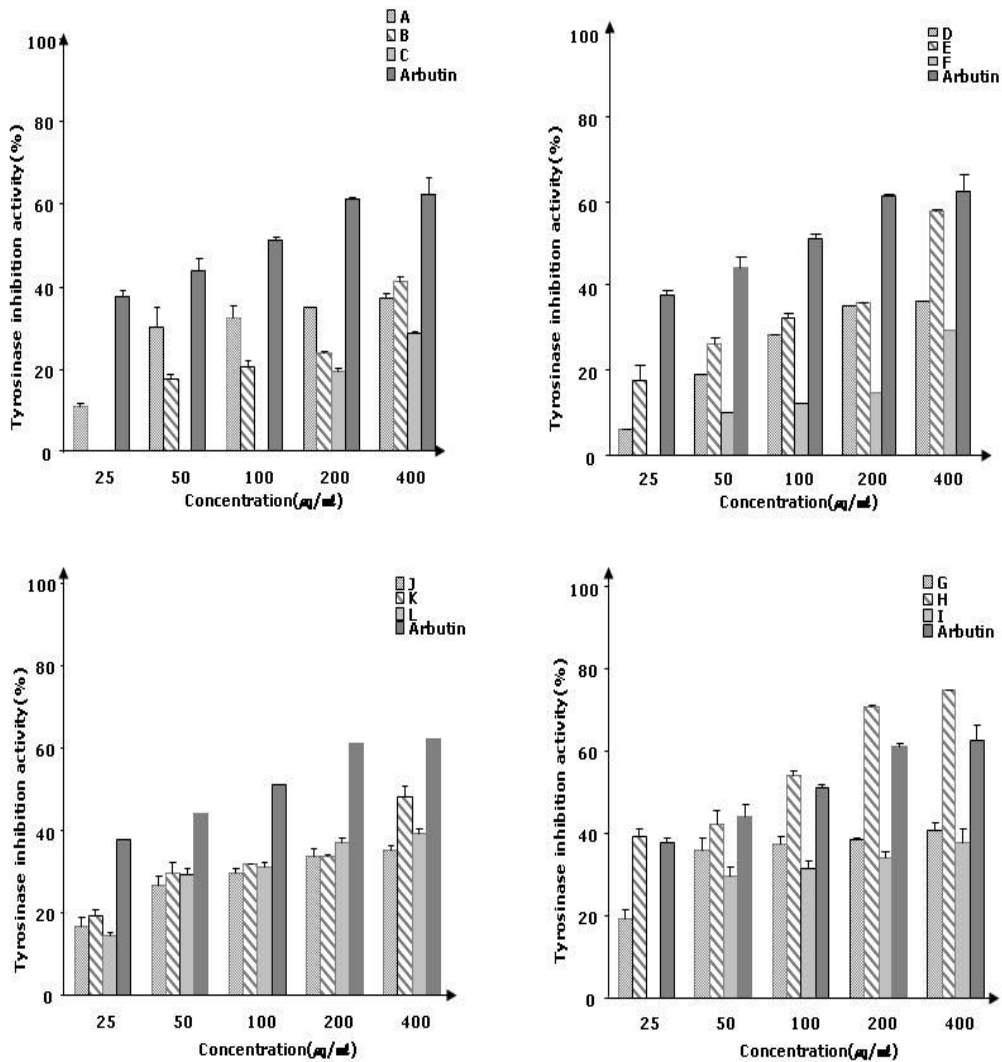


Fig. 11. Tyrosinase inhibitory effect of various plant extracts *in vitro*. A: *Agastache rugosa*, B: *Agrimonia pilosa*, C: *Aralia contientalis*, D: *Artemisia capillaris*, E: *Ephedra sinica*, F: *Evodia rutaecarpa*, G: *Juniperus chinensis*, H: *Morus alba*, I: *Plantago asiatica*, J: *Pyrola japonica*, K: *Reynoutria elliptica*, L: *Thuja orientalis*

4-2. 추출물에 의한 SK-MEL-2 세포생존율

1차 선발된 12종의 추출물이 SK-MEL-2 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 12.5~ 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 다양한 농도로 처리하여 세포 생존율을 확인 하였다. 실험결과 추출물의 처리농도 의존적으로 세포독성이 더 강해지는 것을 관찰하였으며, 각 추출물의 세포 생존율을 60% 이상인 농도를 정하여 다음 실험에 적용하였다 (Fig.12-a, b, c, Table 10.).

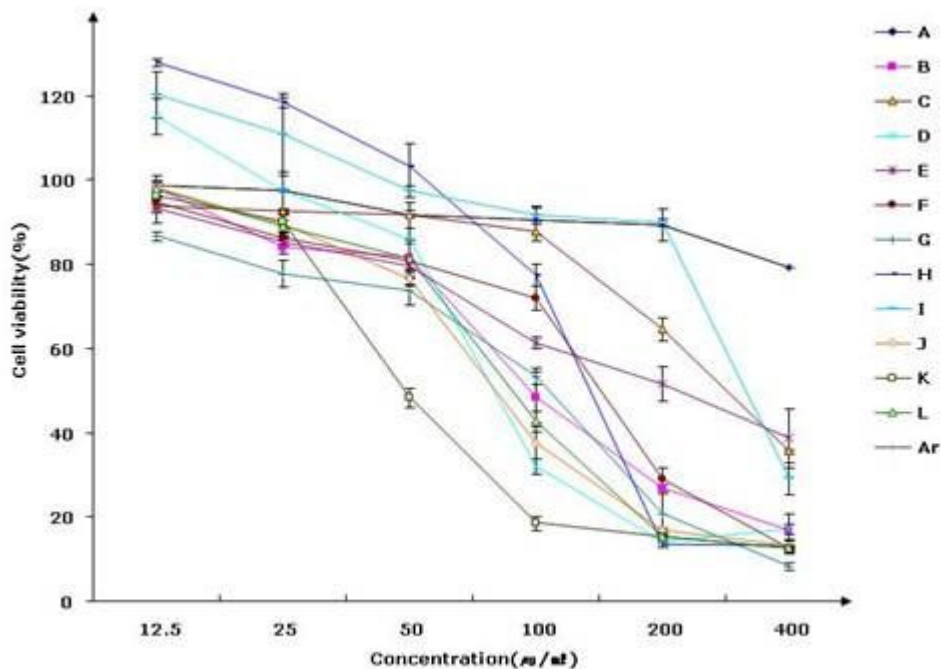


Fig. 12-a. Effect of plant various extracts on viability of SK-MEL-2 cells. Cells were treated with indicated concentrations of various extracts for 24hr. Levels of the cell viability were measured using the MTT assay. The viability of untreated control cells was defined as 100%. Results are shown mean \pm SD (n=3). Ar:Arbutin, A:*Agastache rugosa*, B:*Agrimonia pilosa*, C:*Aralia contientalis*, D:*Artemisia capillaris*, E:*Ephedra sinica*, F:*Evodia rutaecarpa*, G:*Juniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I:*Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K:*Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

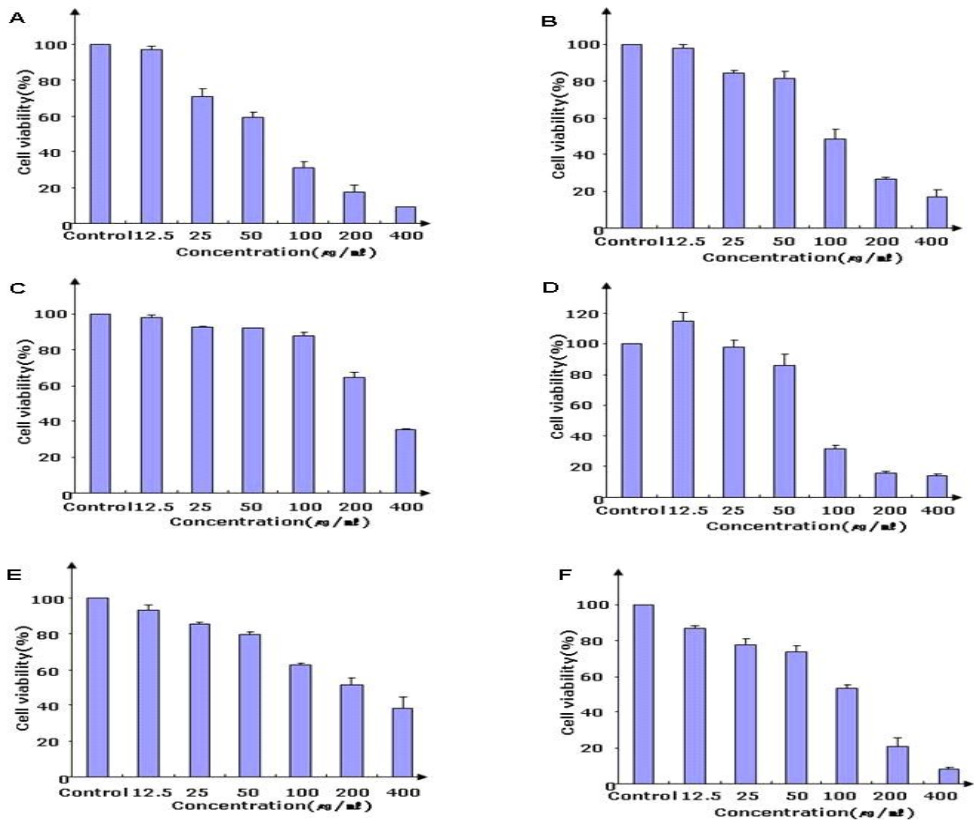


Fig. 12-c. Effect of various plant extracts on cell viability of SK-MEL-2 cells. Cells were treated with indicated concentrations of various extracts for 24hr. Cell viabilities were measured using the MTT assay. The viability of untreated control cells was defined as 100%. Results are shown as mean \pm SD (n=3). A:*Agastache rugosa*, B:*Agrimonia pilosa*, C:*Aralia contientalis*, D:*Artemisia capillaris*, E:*Ephedra sinica*, F:*Evodia rutaecarpa*

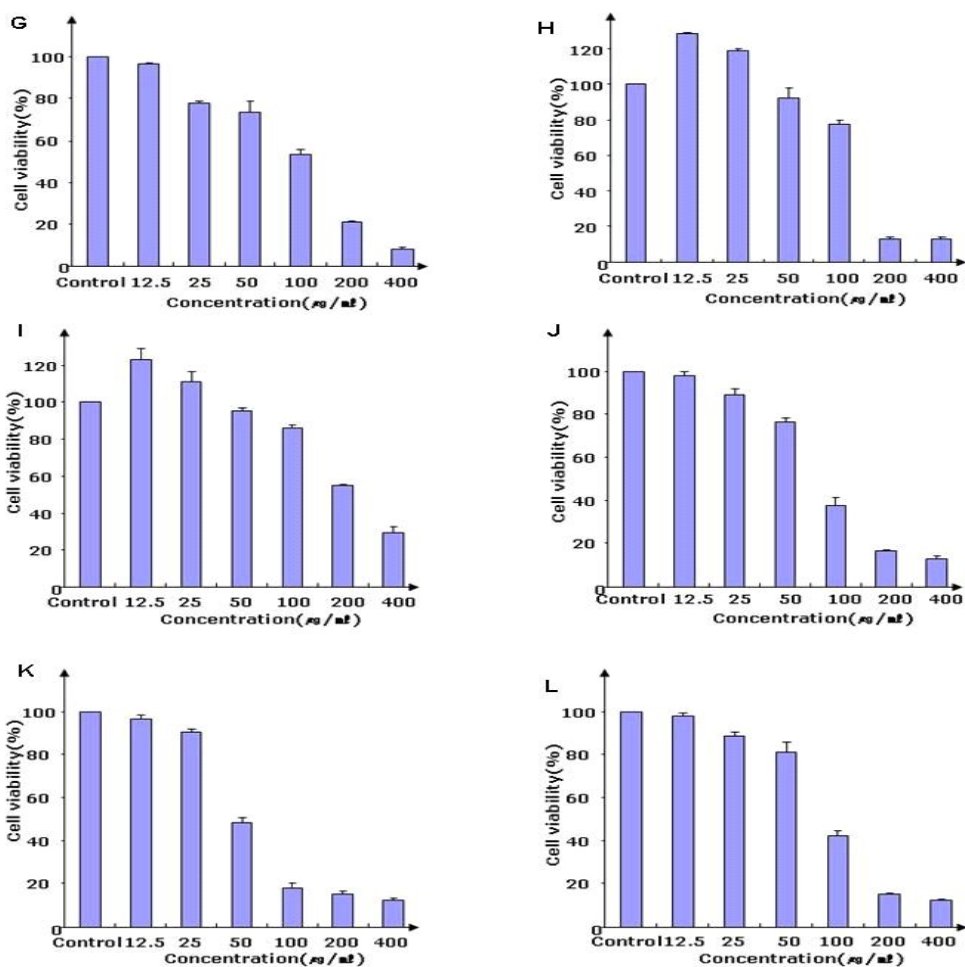


Fig. 12-d. Effect of various plant extracts on cell viability of SK-MEL-2 cells. Cells were treated with indicated concentrations of various extracts for 24hr. Cell viabilities were measured using the MTT assay. The viability of untreated control cells was defined as 100%. Results are shown as means \pm SD (n=3). G: *Juniperus chinensis*, H: *Morus alba*, I: *Plantago asiatica*, J: *Pyrola japonica*, K: *Reynoutria elliptica*, L: *Thuja orientalis*

Table 10-b. Effect of various plant extracts on viability of SK-MEL-2 cells. Cells were treated with indicated concentrations of various extracts for 24hr. Levels of the cell viability were measured using the MTT assay.

Sampls	Concentration($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)					
	12.5	25	50	100	200	400
<i>Agastache rugosa</i>	96.62± 2.3	70.81± 4.3	59.02± 3.0	30.91± 3.4	17.12± 3.8	9± 0.1
<i>Agrimonia pilosa</i>	98± 1.9	84.13± 1.7	81.69± 3.3	48.43± 5.1	26.75± 1.0	16.66± 3.9
<i>Aralia contionalis</i>	97.72± 1.4	92.45± 0.2	91.72± 0.2	87.52± 1.9	64.59± 2.7	35.48± 0.5
<i>Artemisia capillaris</i>	114.36± 5.0	97.45± 4.4	85.85± 5.0	31.99± 1.9	16.06± 1.2	14.06± 1.2
<i>Ephedra sinica</i>	93.09± 3.1	85.32± 1.0	79.47± 1.1	62.28± 1.3	51.51± 4.0	38.65± 5.9
<i>Evodia rutaecarpa</i>	94.54± 2.4	86.23± 1.3	80.54± 5.2	71.91± 2.8	28.89± 2.6	12.52± 0.1
<i>Juniperus chinensis</i>	96.68± 1.0	77.76± 3.1	73.59± 3.2	53.35± 1.9	20.76± 4.8	8.15± 0.8
<i>Morus alba</i>	127.81± 0.9	118.42± 1.1	92.13± 5.6	77.45± 2.5	13.53± 0.6	13.02± 1.2
<i>Plantago asiatica</i>	123.23± 5.8	110.9± 5.	95.32± 1.4	85.72± 1.8	54.77± 0.9	29.09± 3.1
<i>Pyrola japonica</i>	97.93± 1.9	89.35± 2.5	76.47± 1.6	37.58± 3.0	16.61± 0.8	13.08± 1.3
<i>Reynoutria elliptica</i>	96.31± 2.2	90.21± 1.4	48.32± 2.3	18.43± 1.6	15.19± 1.6	12.35± 1.2
<i>Thuja orientalis</i>	97.69± 1.9	88.94± 1.5	81.26± 4.5	42.26± 2.3	15.23± 0.4	12.59± 0.6

4-3. 추출물이 SK-MEL-2 세포내의 Tyrosinase 활성도 및 Melanin 생성량에 미치는 영향

1차 선발된 12종의 추출물이 Sk-MEL-2 세포내의 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각 추출물의 생존율의 농도에 따라 처리한 후 확인 하였다. tyrosinase 효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 12종 추출물 중 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리에서 대조군인 arbutin은 82.2%로 tyrosinase의 활성이 감소에 비해서 *Morus alba*와 *Ephedra sinica*는 각각 24.2%, 36.36% 로 tyrosinase의 활성이 감소하였다 (Fig. 13-a, 13-b).

Melanin 생성량 측정결과, 12종의 추출물 중 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리에서 되어 대조군인 arbutin 83.99% melanin 생성량이 저해에 비해서 *Morus alba*와 *Ephedra sinica*는 각각 83.66%, 63.9%로 melanin 생성량이 저해 되었다 (Fig. 14-a, 14-b).

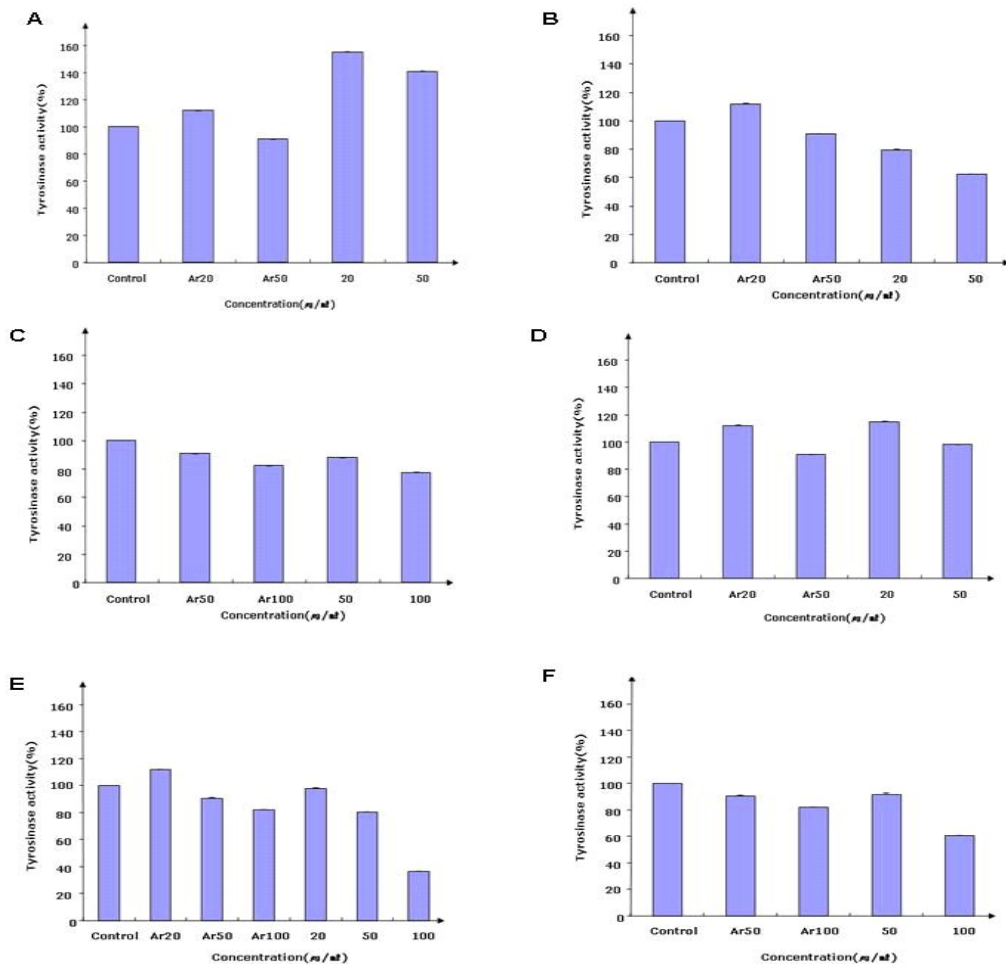


Fig. 13-a. Inhibitory effect of various plant extracts on tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of plant extracts in SK-MEL-2 cells for 72hr. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm of at least three experiments each are performed in triplicate. Ar:Arbutin, A: *Agastache rugosa*, B: *Agrimonia pilosa*, C: *Aralia continentalis*, D: *Artemisia capillaris*, E: *Ephedra sinica*, F: *Evodia rutaecarpa*

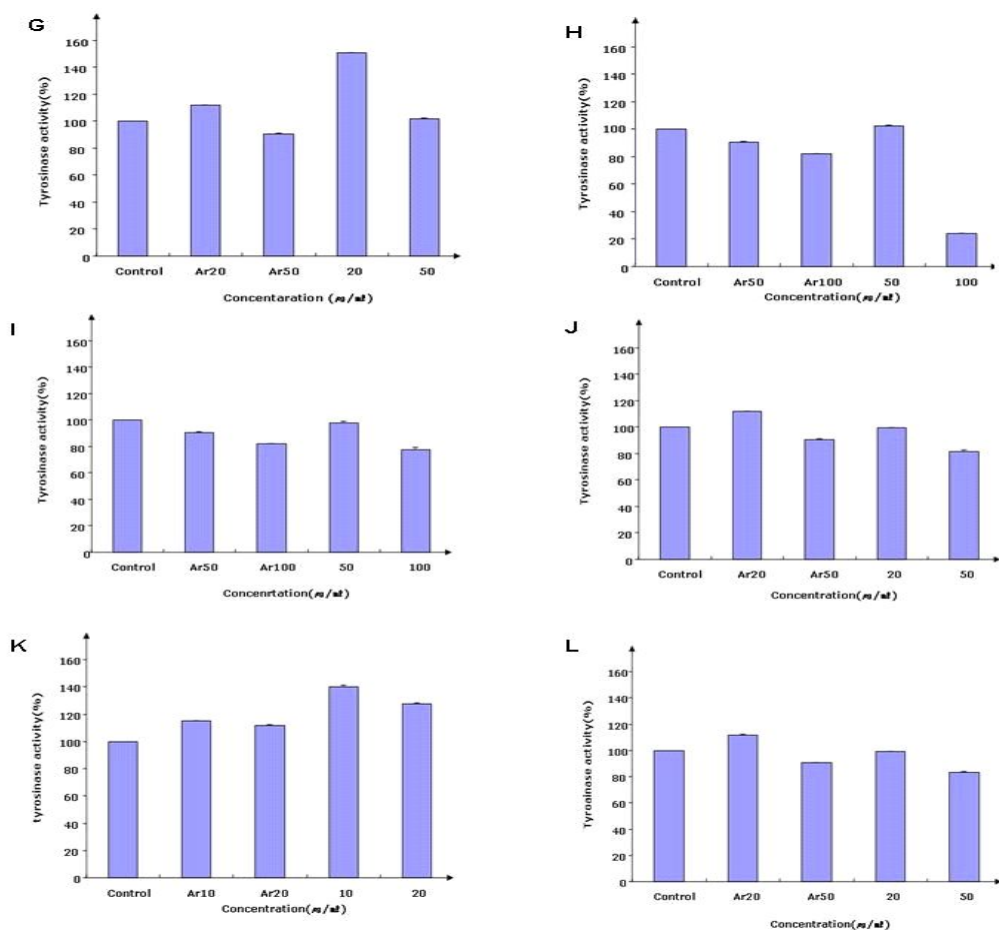


Fig. 13-b. Inhibitory effect of various plant extracts on tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of plant extracts in SK-MEL-2 cells for 72hr. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm of at least three experiments each are performed in triplicate. Ar:Arbutin, G:*J uniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I:*Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K: *Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

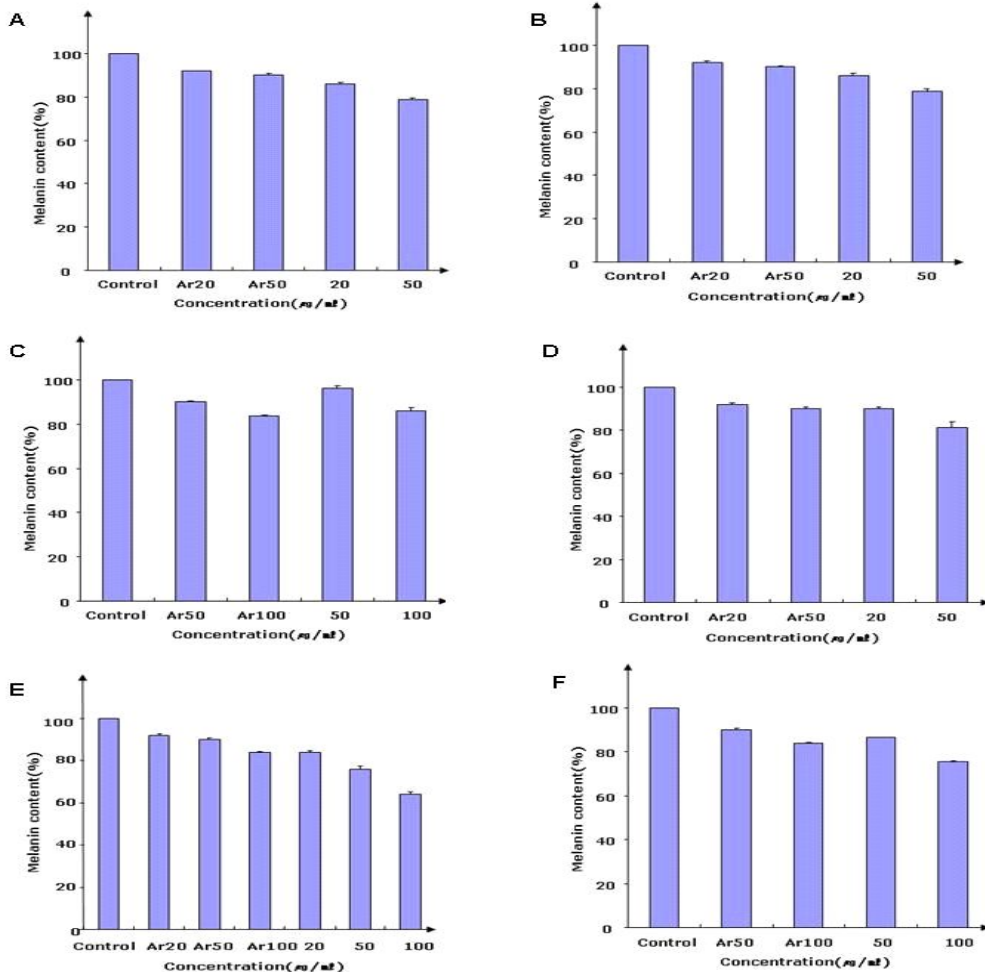


Fig. 14-a. Inhibitory effect of various plant extracts on melanin production in SK-MEL-2 cells. Melanin were determined in the cell after 72hr incubation. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm of at least three experiments each are performed in triplicate. Ar:Arbutin, A:*Agastache rugosa*, B:*Agrimonia pilosa*, C:*Aralia contientalis*, D:*Artemisia capillaris*, E:*Ephedra sinica*, F:*Evodia rutaecarpa*

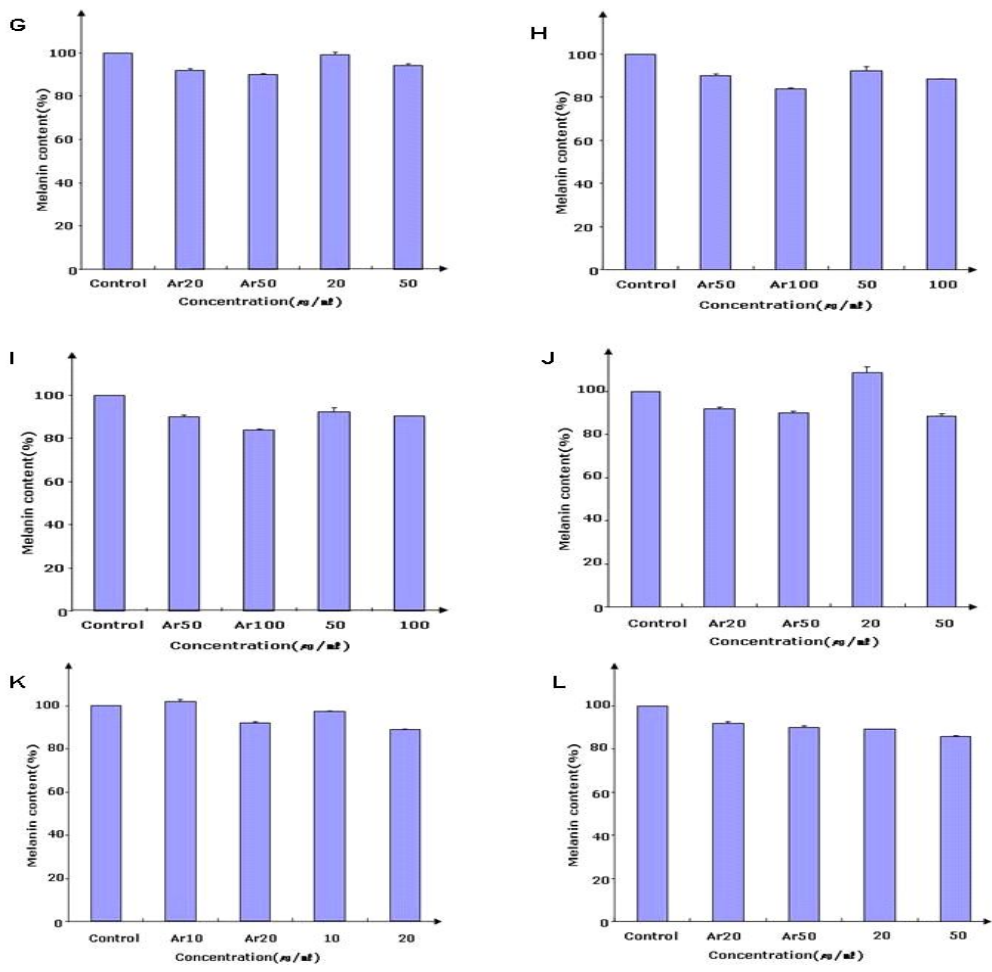


Fig. 14-b. Inhibitory effect of various plant extracts on melanin production in SK-MEL-2 cells. Melanin were determined in the cell after 72hr incubation. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm of at least three experiments each are performed in tirplicate. Ar:Arbutin, G:*Juniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I: *Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K:*Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

4-4. 추출물이 Melanin 합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향

1차 선별된 12종의 추출물로 SK-MEL-2 세포내의 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성량 측정 결과 *Ephedra sinica*, *Morus alba*에서 우수한 효과를 확인 하였다. 위 결과를 바탕으로 본 연구에서 western blot을 이용하여 melanin 합성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 세포주에 추출물과 arbutin을 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 48시간 동안 처리한 결과 *Ephedra sinica*는 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 모두 arbutin에 비해 tyrosinase와 TRP-2에서 높은 발현 억제 효과를 나타냈으며 농도 의존적으로 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 그러나 TRP-1에서는 억제 효과를 나타내지 않았다. *Morus alba*와 arbutin는 *Ephedra sinica*에 비해 tyrosinase와 TRP-2의 억제 효과가 낮게 나타났으며 TRP-1에서도 *Ephedra sinica*와 같이 억제 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 15).

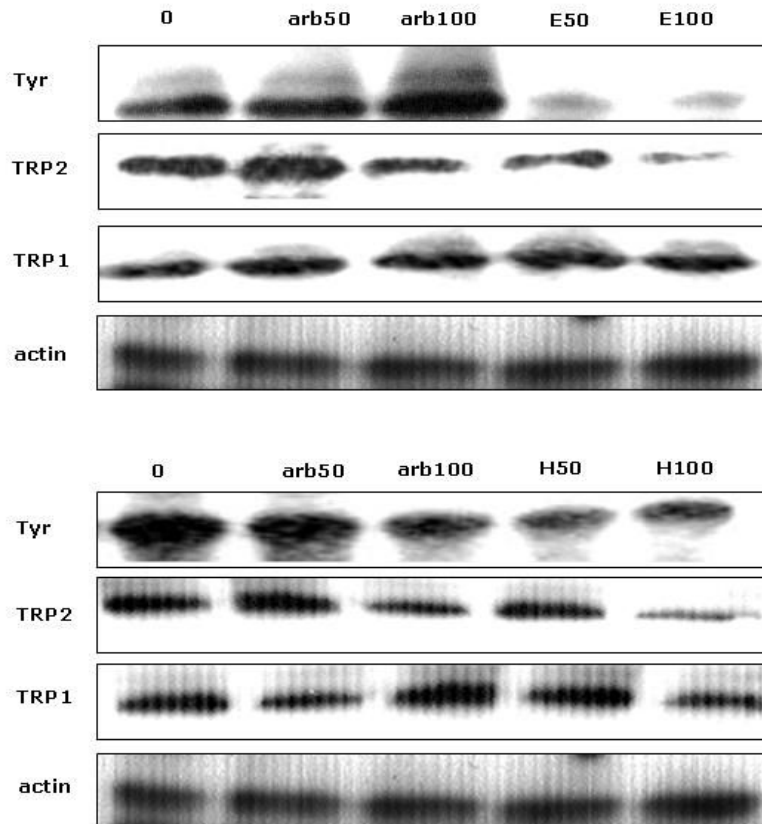


Fig. 15. Inhibitory effect of arbutin, *Ephedra sinica* and *Morus alba* on melanogenesis-related protein expression. Cells were incubated with arbutin, *Ephedra sinica* and *Morus alba*. After treatment for 72hr, cell lysates were the subjected to western blot analysis using tyrosinase, TRP-1and TRP-2 as described in materials & methods.

arb: arbutin, E: *Ephedra sinica*, H: *Morus alba*

4-5. α -MSH 유도에 의한 Tyrosinase 활성도 및 Melanin 생성량에 미치는 추출물의 효과

외부자극에 의해 유발된 SK-MEL-2 세포의 과색소침착에 1차 선발된 12종의 추출물이 어떤 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 α -MSH (200nM) 병용 처리하여 72시간 배양한 후 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성량을 측정하였다. Tyrosinase 활성의 실험 결과 α -MSH (200nM) 단일처리군은 191%로 tyrosinase 활성이 증가 되었으며, arbutin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 71.85%로 tyrosinase 활성이 감소되었다. 12종 추출물 중 *Ephedra sinica* 와 *Morus alba*는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때 각각 66.32%, 78.97%로 tyrosinase 활성이 감소되었다 (Fig. 16-a, 16-b). Melanin 생성량 실험결과 대조군에 비하여 α -MSH (200nM) 단일처리군은 145.69% 로 증가 되었지만. arbutin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 106.67%로 melanin 생성이 감소 되었고, 12종 추출물 중 *Ephedra sinica* 와 *Morus alba*는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때 각각 93.45%, 105.66%로 melanin 생성량이 감소되었다 (Fig. 17-a, 17-b).

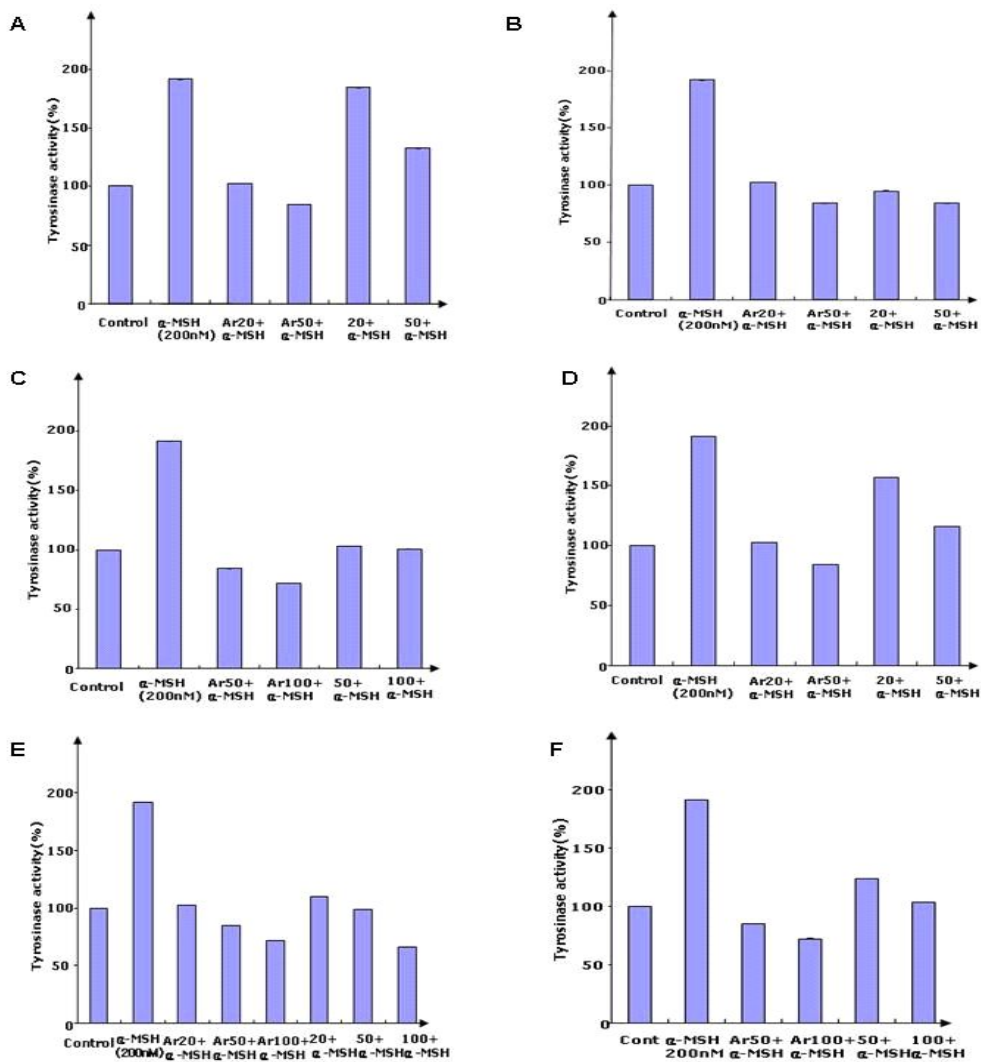


Fig. 16-a. Inhibitory effect of various plant extracts and α -MSH on the tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of plant extracts and α -MSH in SK-MEL-2 cells for 72hr. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm of at least three experiments performed in triplicate. Ar:Arbutin, A:*Agastache rugosa*, B:*Agrimonia pilosa*, C:*Aralia contientalis*, D:*Artemisia capillaris*, E:*Ephedra sinica*, F:*Evodia rutaecarpa*

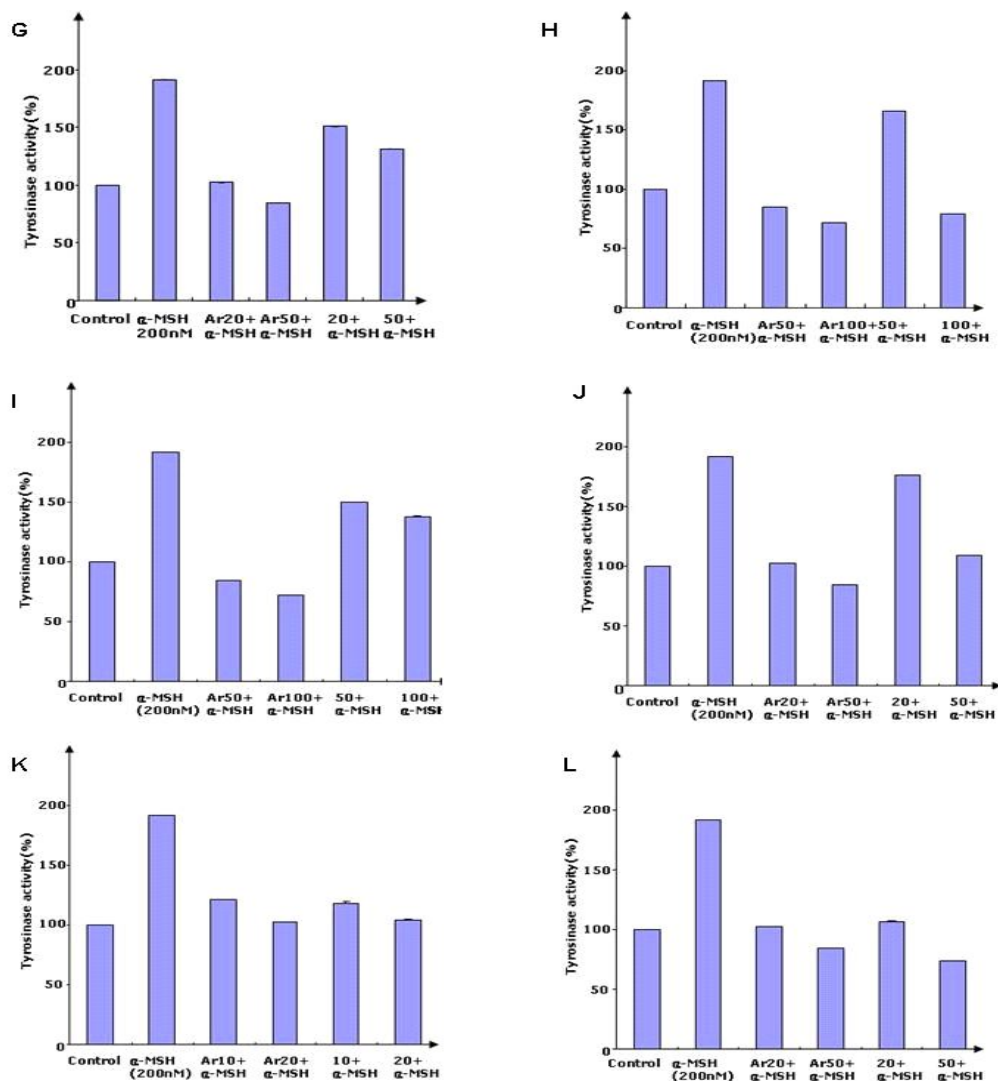


Fig. 16-b. Inhibitory effect of various plant extracts and α -MSH on the tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of plant extracts and α -MSH in SK-MEL-2 cells for 72hr. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm of at least three experiments performed in triplicate. Ar:Arbutin, G:*Juniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I:*Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K:*Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

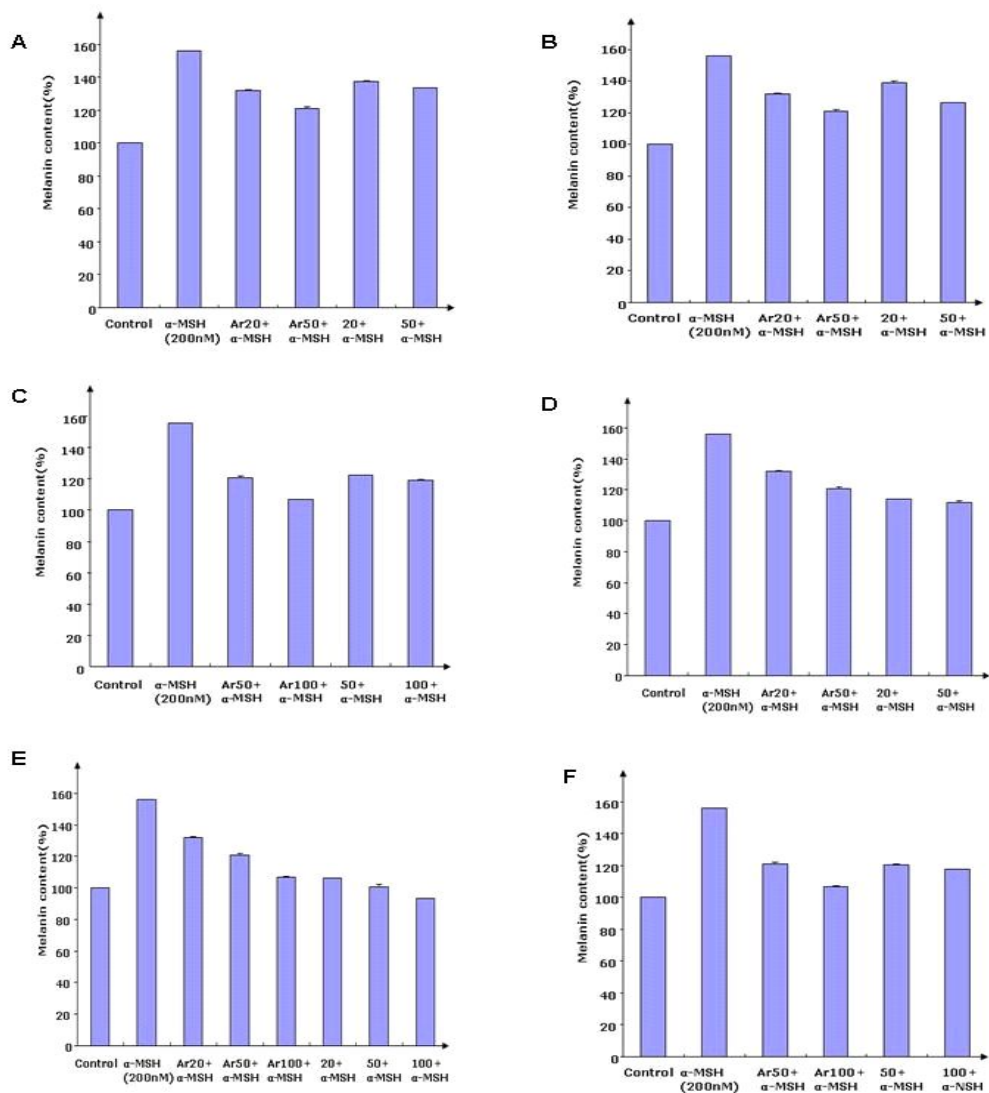


Fig. 17-a. Inhibitory effect of various plant extracts and α -MSH on melanin production in SK-MEL-2 cells. Melanin were determined in the cell after 72hr incubation. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm of at least three experiments performed in tirplicate. Ar:Arbutin, A:*Agastache rugosa*, B:*Agrimonia pilosa*, C:*Araliacontientalis*, D:*Artemisia apillaris*, E:*Ephedra sinica*, F:*Evodia rutaecarpa*

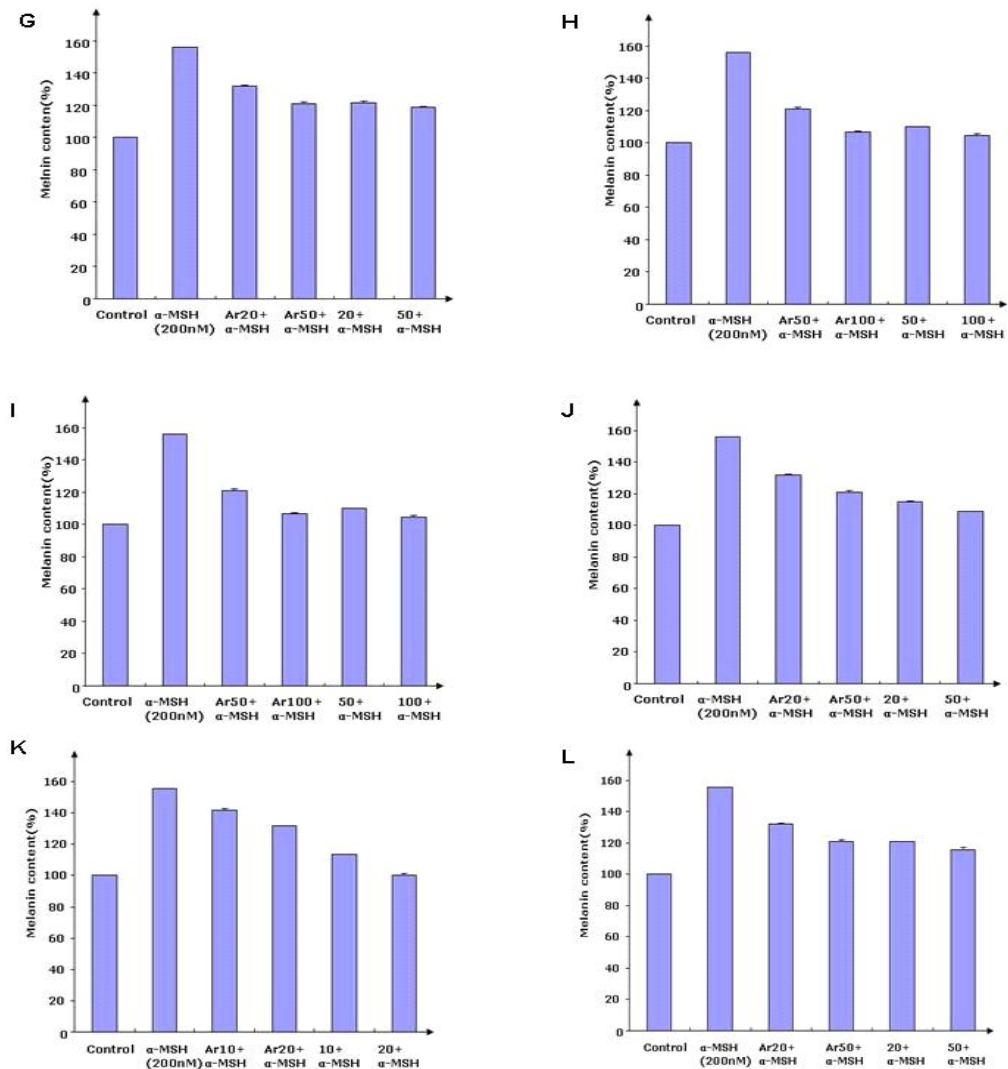


Fig. 17-b. Inhibitory effect of various plant extracts and α -MSH on melanin production in SK-MEL-2 cells. Melanin were determined in the cell after 72hr incubation. Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean \pm of at least three experiments performed in tirplicate. Ar:Arbutin, G:*Juniperus chinensis*, H:*Morus alba*, I:*Plantago asiatica*, J:*Pyrola japonica*, K:*Reynoutria elliptica*, L:*Thuja orientalis*

4-6. α -MSH의 과 색소침착 시 Melanin 합성 관련 단백질 발현에 미치는 추출물의 영향

1차 선발된 12종의 추출물이 SK-MEL-2 세포에 α -MSH를 유도 하였을 때 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성량 측정 결과 *Ephedra sinica*, *Morus alba* 에서 우수한 효과를 확인 하였다. 위 결과를 바탕으로 western blot을 이용하여 melanin 합성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. α -MSH로 과색소침착을 유도시킨 세포주에 추출물과 arbutin을 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 48시간 동안 처리한 결과 α -MSH로 유도시키지 않은 세포주를 이용한 실험 결과와 같이 *Ephedra sinica*는 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 모두 arbutin에 비해 tyrosinase와 TRP-2에서 높은 발현 억제 효과를 나타냈으며 농도 의존적으로 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 그러나 TRP-1에서는 억제 효과를 나타내지 않았다. *Morus alba*와 arbutin은 *Ephedra sinica*에 비해 tyrosinase와 TRP-2의 억제 효과가 낮게 나타났으며, TRP-1에서도 *Ephedra sinica*와 같이 억제 효과를 나타내지 않았다 (Fig.18).

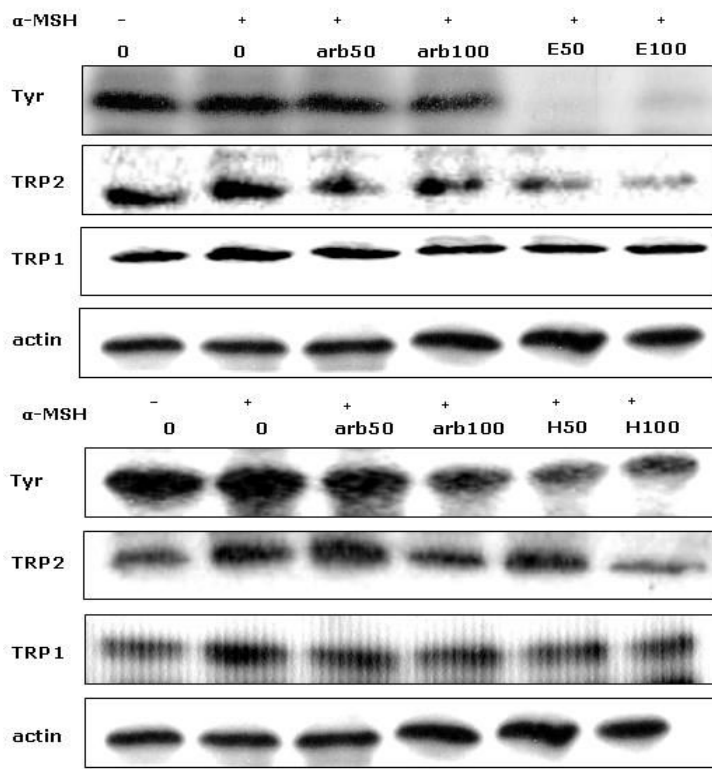


Fig. 18. Inhibitory effect of arbutin, *Ephedra sinica* and *Morus alba* on melanogenesis-related protein expression in the presence of 200 nM α -MSH. Cells were incubated with arbutin, *Ephedra sinica* and *Morus alba* and α -MSH (200nM). After treatment for 72hr, cell lysates were the subjected to western blot analysis using tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 as described in materials & methods. arb: arbutin+ α -MSH, E: *Ephedra sinica* + α -MSH, H: *Morus alba* + α -MSH

IV. 고찰

피부는 신체 중 가장 넓은 면적의 기관으로 항상 산소와 접촉하고 자외선에 노출되어 있어 활성산소종에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 존재한다. 산소는 대사과정 중 일부분이 superoxide radical (O_2^-), 과산화수소 (H_2O_2), hydroxyl radical (HO), Singlet oxygen (1O_2)과 같은 활성 유해산소로 변환되는데 이들은 지질과산, 단백질 산화, 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 멜라닌 생성 반응의 촉진, DNA의 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기시킨다. 이에 따라 피부에 아토피피부염, 여드름, 피부노화, 과 색소 침착 등 가속화시킬 수 있다 (Adelman *et al.*, 1988).

본 연구에서는 약용식물 100종을 absolute ethanol 로 추출한 후 이 추출물에 대해 피부 상재균주 중 피부에 염증을 유발하는 *S. epidermidis* 균에 대한 항균활성을 paper disc방법에 따라 1차 스크리닝 하여 추출물 농도 0.5 mg/disc에서 항균활성을 갖는 식물추출물로 *Agastache rugosa*, *Agrimonia pilosa*, *Aralia contientalis*, *Artemisia capillaries*, *Ephedra sinica*, *Evodia rutaecarpa*, *Juniperus chinensis*, *Morus alba*, *Plantago asiatica*, *Pyrola japonica*, *Reynoutria elliptica*, *Thuja orientalis*의 총 12종의 추출물을 선택하였다 (Table 2.).

S. epidermidis 균은 아토피 피부염에 매우 중요한 인자중의 하나로 황색포도상구균이며 아토피 환자의 90% 정도는 피부에 포도상 구균과 연쇄상 구균이 감염되어 있으며 아토피 질환은 황색 포도상 구균이 생산하는 초 항원 (super antigen) 독소에 의해서 피부염이 유발 또는 악화 되는 것으로 알려져 있다 (Heaton *et al.*, 2003). *S. epidermidis* 에 대한 1차 선별된 12종의 추출물의 항균활성을 실험한 결과 *Agastache rugosa*, *Juniperus chinensis*, *Morus alba*, *Reynoutria elliptica*에서 우수한 항균활성이 확인되었으며, *Agastache rugosa* 은 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 생육이 저해 되었다 (Table 3, Fig. 2, Table 5).

S. aureus 에 대해서는 *Agastache rugosa*, *Agrimonia pilos*, *Morus alba*에서

우수한 항균활성이 확인되었으며, *Agrimonia pilosa*가 3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 생육이 저해 되었다 (Table 3, Fig. 2, Table 5).

P. acnes 는 그람 양성균으로 피부에서 가장 빈번하게 일어나는 질병인 여드름과 밀접하게 연관되어 있으며, 1차 선발된 12종의 추출물의 항균활성 확인 결과 *Agrimonia pilosa*, *Aralia contientalis*, *Ephedra sinica*, *Evodia rutaecarpa*, *Juniperus chinensis*, *Morus alba*, *Plantago asiatica*, *Reynoutria elliptica*, *Thuja orientalis*에서 우수한 항균활성이 확인되었으며, *Agrimonia pilosa*, *Ephedra sinica*, *Morus alba*가 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 생육이 저해되어짐을 확인 하였다 (Table 3, Fig. 2, Table 5).

비듬이란 두피의 노화 각편이 쌀겨모양으로 탈락하는 것과 피지의 분해산화물이 혼합된 상태로, 피부세포에서 자연스럽게 생겨나게 되는 신진대사의 부산물이며 증상이 심해질 경우 통증이나 가려움증 또는 염증이나 홍반을 동반하며, 탈모증까지 유발될 수 있다 (Roberts, 1969). 비듬 생성 원인균인 *P. ovale*에 대한 1차 선발된 12종의 추출물의 항균활성 측정결과 *Agastache rugosa*, *Aralia contientalis*, *Artemisia capillaries*, *Ephedra sinica*, *Juniperus chinensis*, *Morus alba*, *Pyrola japonica*, *Reynoutria elliptica*, *Thuja orientalis*에서 우수한 항균활성이 확인되었으며, *Agastache rugosa*, *Agrimonia pilosa*, *Artemisia capillaries*, *Morus alba*, *Thuja orientalis*가 3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 생육이 저해되었다. *M. furfur*에서는 *Agastache rugosa*, *Aralia contientalis*, *Artemisia capillaries*, *Ephedra sinica*, *Evodia rutaecarpa*, *Juniperus chinensis*, *Morus alba*, *Reynoutria elliptica*, *Thuja orientalis*에서 우수한 항균활성이 확인되었으며, *Morus alba*는 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 생육이 저해 되었다 (Table 4, Fig. 3, Table 5).

표재성 피부 칸디다증은 피부와 점막에 생기는 표재성 질환으로 *C. albicans* 가 주 원인균으로 알려져 있으며 (Odom et al., 2000), *C. albicans* 에 대한 1차 선발된 12종의 추출물의 항균활성 실험결과 *Agastache rugosa*, *Morus alba*, *Ephedra sinica*에서 우수한 항균활성이 나타났으며, *Morus alba*가 3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

농도에서 생육이 저해 되었다(Table 4, Fig. 3, Table 5). 이러한 결과는 손등은 335종의 추출물로 피부 여드름 치료제 개발을 위한 천연물의 항균활성검색에서 오수유, 상백피, 독활, 호장근, 은행, 고삼추출물에서 우수한 저해효과가 있다는 보고와 유사하였다 (Sohn *et al.*, 2006),

폴리페놀 화합물은 phenolic hydroxyl 그룹으로 인하여 효소 단백질 같은 거대분자들과 결합하는 성질이 있어 항균 및 항산화 활성 등을 나타낸다 (Park, 2003). 따라서 1차 선별된 12종의 추출물에 대한 폴리페놀 함량을 측정된 결과 *Reynoutria elliptica*에서 209.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 높은 함량을 나타냈고, *Artemisia capillaris* 193.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Evodia rutaecarpa* 176.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Ephedra sinica* 175.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Plantago asiatica* 174.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Morus alba* 119.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Pyrola japonica* 107.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 등이 페놀 함량이 우수하게 나타났다 (Table 6).

식물계에 존재하는 flavonoid 는 지방질의 산화, 활성 산소의 소거 및 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장 질환 등을 예방하거나 지연하는 효과를 나타내고 있는 것으로 알려져 있다 (Park *et al.*, 2003).

1차 선별된 12종의 추출물의 플라보노이드 함량을 확인한 결과 *Artemisia capillaries*에서 138.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 플라보노이드 함량이 가장 높게 나타났고, *Plantago asiatica* 130.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Agastache rugosa* 87.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Reynoutria elliptica* 83.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Evodia rutaecarpa* 73.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 등에서 플라보노이드 함량이 비교적 높게 나타남을 확인할 수 있었다 (Table 6).

1차 선별된 12종 추출물의 천연항산화제로의 이용 가능성을 확인하기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정된 결과 *Ephedra sinica* 27.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Reynoutria elliptica* 39.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Evodia rutaecarpa* 49.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Agrimonia pilosa* 58.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 나타났으며, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 *Reynoutria elliptica*, *Evodia rutaecarpa*, *Plantago asiatica*, *Ephedra sinica* 등이 vitamin C 와 유사한 효과를 나타냄을 확인하였다 (Table 7, Fig. 4.).

식품의 가공 및 저장 식육제품에 첨가된 독소생성억제와 발색, 산패방지제로

널리 이용되고 있는 아질산염은 그 자체가 독성이 있어 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중의 헤모글로빈의 Fe^{+2} 가 Fe^{+3} 으로 산화하는데 이러한 경우 헤모글로빈의 산소운반능력이 감소되고 그 결과 산소 결핍증에 걸리게 된다. 아질산염은 비타민 A 대사와 갑상선 기능을 억제하고 amine 류와 반응하여 nitrosoamine이라는 발암물질을 생성한다 (Macrae *et al.*, 1993 ; Kim and joun, 2006). 또한 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2급, 3급 아민과의 nitroso화 반응은 위장내의 낮은 산성조건에서 쉽게 일어나며 발암물질인 nitrosoamine을 생성할 수 있는 것으로 보고되고 있다 (Bartsh *et al.*, 1998 ; Kim and joun, 2006). 따라서 1차 선발된 12종의 추출물 pH 1.2의 조건에서 농도에 따라 측정된 결과 *Evodia rutaecarpa*, *Ephedra sinica*, *Reynoutria elliptica* 순으로 우수한 활성을 나타내었으며, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 68.75%, 68.37%, 55.67%로 비교적 높은 아질산염 소거능을 보였다 (Fig. 5). 항산화 실험결과는 선학초 추출물의 항산화 활성 (Min *et al.*, 2008)과 호장근의 항산화활성 연구 결과 (Kim *et al.*, 2007), 마황의 항산화 연구 결과 (Kim, 2008)와 유사하였다.

활성산소종은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 정상적인 대사과정에도 생성되며, 질병이나 스트레스, 공해, 흡연 등의 상태에서 과잉으로 생성 된다. 피부의 임상적 특징은 주름이 발생하며, 색소 침착, 피부가 매우 거칠고, 건조해지며 탄력성이 감소된다 (Adelman *et al.*, 1988).

노화를 방지하기 위한 항산화 작용을 측정하기 위해, 1차 선발된 12종의 추출물이 H_2O_2 로 자극된 HaCaT 세포에서 ROS를 제거능을 실험한 결과 12종의 추출물 중 20, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 *Agrimonia pilosa* 은 55.99%, 47.06%, *Evodia rutaecarp* 는 61.07%, 42.46%, *Ephedra sinica* 이 76.23%, 74.09%로 ROS가 감소되어, 추출물은 처리농도 의존적으로 ROS 제거능을 가지는 것으로 확인되었다 (fig. 7-a)

1차 선발된 12종의 추출물이 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과를 확인하기 위해 H_2O_2 , rotenone , paraquat 로 산화적 스트레스를 유도하

였다.

H₂O₂ 는 다양한 세포 실험에서 산화적 스트레스를 생성하는 자극원으로 알려져 있다 (Bi *et al.*, 2008). 추출물의 HaCaT 세포의 보호효과를 확인한 결과 실험군은 39.5% 세포생존율을 나타낸 반면, 12종의 추출물 중 *Ephedra sinica* 은 실험군에 비해서 각각 25%, 50%, *Aralia cordata*은 각각 10%, 20% *Plantago asiatica*는 각각 10%, 16%의 보호효과가 증대 되었다 (Fig. 8-a.).

Rotenone은 농약 용도로 사용되며, 생체 내의 각종 세포에 산화적 손상을 일으켜 결국 Apoptosis에 이르게 하는 것으로 알려져 있다 (Molina *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2001). 추출물의 HaCaT 세포의 보호효과를 확인한 결과 실험군은 55.18%이하의 세포생존율을 나타낸 반면, 12종의 추출물 중 *Ephedra sinica*는 실험군에 비해서 각각 17%, 45%, *Morus alba*는 각각 30%, 35% *Plantago asiatica*가 각각 9%, 16%의 보호효과가 증대 되었다 (Fig. 9-a.).

Paraquat는 제초제로 중독작용, 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 일으키는 것으로 보고되고 있다 (Willis *et al.*, 2007). HaCaT 세포의 보호효과를 확인한 결과, 실험군은 48.14% 이하의 세포생존율을 나타낸 반면, 12종 추출물 중 *Ephedra sinica*는 실험군에 비해서 각각 4%, 7%의 보호효과가 증대 되었고, *Reynoutria elliptica*는 각각 3%, 9%, *Artemisia capillaris*는 각각 6%, 7%의 보호효과가 증대 되었다 (Fig. 10-a.). 이상의 3가지 Chemical에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포의 보호효과 실험에서 *Ephedra sinica* 추출물이 가장 우수하였으며, 이러한 결과는 임의 (Lim, 2007) 황금의 산화적 스트레스 보호효과 보다 우수한 결과임을 확인 할 수 있었다.

1차 선별된 12종 추출물의 미백효과를 확인하기 위하여 *in vitro* 에서 tyrosinase 저해 활성 측정한 결과 12종의 추출물 중에서 *Morus alba*, *Ephedra sinica*, *Reynoutria elliptica* 등이 농도 의존적으로 우수한 억제율을 보였다 (Fig. 11).

최근 미백관련 연구는 마황 (Yoo *et al.*, 2005), 백삼과 홍삼 (Hwang *et al.*, 2006), 뽕잎 (Park *et al.*, 2007), 삼백초 (Park *et al.*, 2008), 목단피

(You *et al.*, 2009) 등을 이용한 실험결과 등이 보고되고 있다. 본 연구에서는 인간 유래 흑색종 세포인 SK-MEL-2의 세포내의 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 실험결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도처리에서 대조군인 arbutin은 82.2%로 tyrosinase의 활성이 감소에 비해서 *Morus alba*와 *Ephedra sinica*는 각각 24.2%, 36.36%로 tyrosinase의 활성이 감소하였으며, melanin 생성량 측정결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도처리에서 대조군인 arbutin 83.99% melanin 생성량이 저해에 비해서 *Morus alba* 와 *Ephedra sinica*는 각각 83.66%, 63.9%로 melanin 생성량이 저해 되었으며 (Fig. 13, Fig. 14), *Ephedra sinica*는 *Morus alba*, abutin 보다 tyrosinase 와 TRP-2 의 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 15)

α -MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비 되는 pleiotropic molecule로써 표피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절, 멜라닌 색소 생성 등 다양한 생리적 기능에 관여한다. 이는 세포막 수용체 (melanocortin receptor 1, MC1R)와 결합하여 Gs 단백질을 활성화 시키고 이차적으로 adenylate cyclase 활성에 의해 cAMP가 증가되고 연속적으로 protein kinase A (PKA), tyrosinase 활성 등을 통하여 멜라닌 생성을 촉진시킨다, 또한 microphthalmia transcription factor (MITF)단백질의 발현을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현을 촉진한다 (Friedman *et al.*, 1990 ; Hunt *et al.*, 1994).

외부자극에 의해 유발된 SK-MEL-2 세포의 과색소침착에 1차 선발된 12종의 추출물이 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 α -MSH 병용 처리하여 3일간 배양하여 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성량을 측정하였다. α -MSH는 SK-MEL-2 세포내의 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 촉진하여 α -MSH (200nM) 단일처리군은 191%로 tyrosinase 활성이 증가 되었으며, arbutin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)은 71.85%로 tyrosinase 활성이 감소되었다. 12종 추출물 중 *Ephedra sinica*와 *Morus alba*는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하였을 때 각각 66.32%, 78.97%로 tyrosinase 활성이 감소되었다 (Fig. 16-a, 16-b).

Melanin 생성량 실험결과 대조군에 비하여 α -MSH (200nM) 단일처리군은 145.69% 로 증가 되었지만, arbutin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 106.67%로 melanin 생성이 감소되었고, 12종 추출물 중 *Ephedra sinica* 와 *Morus alba*는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하였을 때 각각 93.45%, 105.66%로 melanin 생성량이 감소되었다 (Fig. 17-a, 17-b).

Western blot을 이용하여 α -MSH에 의한 과색소침착시 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질발현에 미치는 영향을 조사한 결과, *Ephedra sinica*는 *Morus alba*, arbutin 보다 tyrosinase와 TRP2의 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 18)

이상의 결과 1차 선별된 12종 추출물 중 *Ephedra sinica* 와 *Morus alba* 추출물은 피부에 염증을 유발할 수 있는 7균주에서 항균활성이 확인 되었으며, 항산화 효과도 우수한 것으로 확인 되었다. 또한 산화 물질에 대한 HaCaT 세포의 산화적 스트레스에 보호효과가 확인 되었다. SK-MEL-2 세포내의 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성에도 우수한 효과가 확인 되었으며, 유전자 발현 억제를 통하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 α -MSH에 의해 증가된 tyrosinase와 melanin의 생성을 매우 효과적으로 감소 시켰다. 이상의 결과를 토대로 향후 *Ephedra sinica* 와 *Morus alba* 추출물을 이용하여 항균, 항산화, 미백과 관련된 피부 기능성 물질과 제품 개발이 가능할 것으로 사료된다.

IV. 결론

본 연구에서는 보다 안전하고 우수한 피부 기능성을 천연물에서 개발하고자 하는 연구 일환으로 100여종의 약용 추출물을 이용하여 피부상재균인 *S. epidermidis*에 대한 항균활성을 1차 스크리닝한 결과 12종의 추출물을 선발하여 이들에 대하여 피부 기능성 물질과 제품 개발을 위한 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 100여종의 약용 추출물을 이용하여 *S. epidermidis*에 대한 항균 활성을 1차 스크리닝한 결과 12종의 추출물을 선발하였다.
2. 1차 선발된 12종의 추출물이 피부 상재균주 중 염증을 유발할 수 있는 7균주에 대한 항균 활성 결과, *Morus alba*가 가장 우수하였으며, *Ephedra sinica*는 7균주에 대해 항균 활성이 확인 되었다.
3. 1차 선발된 12종의 추출물의 항산화 실험 결과 폴리페놀과 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거활성, 아질산염 소거능에서 *Ephedra sinica*, *Reynoutri elliptica*, *Evodia rutaecarpa*에서 우수한 결과가 확인 되었다.
4. 1차 선발된 12종의 추출물의 세포내 ROS 제거능 평가 결과 *Agrimonia pilosa*, *Evodia rutaecarpa*, *Ephedra sinica*에서 우수한 제거능이 확인 되었다.
5. 1차 선발된 12종의 추출물이 H₂O₂, Rotenone, Paraquat에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 HaCaT세포의 보호효과를 측정한 결과 *Ephedra sinica*가 가장 우수한 보호효과가 확인 되었다.
6. 1차 선발된 12종의 추출물 중 tyrosinase 저해 활성 측정 결과 *Morus alba*와 *Ephedra sinica*는 50% 이상의 억제율이 확인 되었다.
7. 1차 선발된 12종의 추출물이 Sk-MEL-2 세포내의 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성량 측정 결과 *Ephedra sinica*가 36.46%, 63.9% 으로 가장 우수하였다.

8. 1차 선발된 12종의 추출물이 α -MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성도 및 melanin 생성량을 측정한 결과 *Ephedra sinica*가 66.32%, 93.45% 으로 가장 우수하였다.
9. Western blot 분석 결과 *Ephedra sinica*는 *Morus alba* 나 arbutin 보다 tyrosinase 단백질 발현을 감소 시켰으며, α -MSH 유도에서 tyrosinase, TRP-2 의 발현을 효과적으로 감소 시켰다.

이상의 결과 1차 선발된 12종의 추출물 중 *Ephedra sinica* 와 *Morus alba*는 항균활성, 항산화 효과, 산화적 스트레스에 대한 보호효과, tyrosinase 유전자 발현 억제를 통하여 멜라닌 합성을 억제 하는 것으로 확인 되었다. 따라서 *Ephedra sinica* 와 *Morus alba* 추출물은 항균, 항산화, 미백과 관련된 피부 기능성 물질과 제품의 개발 가능성이 높은 것으로 기대 된다.

VI 참고문헌

대한 피부과학회 교과서 편찬위원회 편저. 피부과학, 여문각 2001

대한 병리학회. 병리학, 서울 고문사, p71~104, 1995

지형준, 이상인, 안덕균, 이경순, 이숙연, 이영종 편. 대한약전 및 대한 약전 외 한약규격주해 제2개정. 서울: 한국메디칼인텍스사, p185, 1998

Adelman D, Saul RL and Ames BN., Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(8): 2706~2708, 1988

Ahn DK., Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. 1998

Amster D., Susceptibility testing of antimicrobial in liquid media, antibiotics in alboratory medicine. 4th ed. Williams and Wikins, MD, USA. p 52~111, 1996

An BJ, Lee JY, Park TS, Pyron JR, Bae HJ, Song MA, Baek EJ, Park JM, Son JH, Lee CE and Choi KI., Antioxidant Activity and Whitening Effect of Extraction Conditions in *Curcuma Longa* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 14(3):168~172, 2006

Ann YH and Choi JS., The Whitening Effect by Water Extracts of *Bombyx Mori* Linne. *Journal of the Korean Society of Fashion & Beauty*,

4(4):81~86, 2006

AOAC., Official Methods of Analysis, 15th ed. Washington, D.C Association of official Analytical Chemists, 1990

Bae YS, Si CL, Kim JK and Karchesy JJ., Extractive of Juniper Needle. *J. Kor. For. En.* 24(2):24~30, 2005

Bartsh H, Ohshima H and Pignatelli B., Inhibition of endogenous nitrosation: Mechanism and implications in human cancer prevention. *Mutat. Res.* 202:307~324, 1998

Bi J, Jiang B, Liu JH, Lei C, Zhang XL and An LJ., Protective effects of catalpol against H₂O₂-induced oxidative stress in astrocytes primary cultures. *Neurosci. Lett.*, 442(3):224~227, 2008

Bissett DL, Chatterjee R and Hannon DP., Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem. Photobiol.*, 54:215~223, 1991

Block G and Langseth L., Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol*, 48:80~85, 1994

Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181:1199~1200, 1958

Burton J. L and S. Shuster., The relationship between seborrhea and acne

vulgaris. *Br. J. Dermatol.*, 84:600~604, 1971

Busca R, Bertolotto C, Ortonne JP and Ballotti R., Inhibition of the phosphatidylinositol-3-kinase/p70^{S6}-Kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation, *J. Bio. Chem.*, 271(50):24~30, 1996

Chang, J and Inui T., Novel phenolic glycoside dimer and trimer from the whole herb of *Pyrola rotundifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, 53(8):1051~1053, 2004

Choi SR, Kim DH, Park CB, You DH, Ryu J, Eun JS and Kim JY., Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Artrmisa capillaries* Thunberg. *Korean j. Medicinal Crop Sci.*, 16(2):112~117, 2008

Cheong KO, Nam KS, Park JH, Shigetoshi K and Moon JO. Development of the SOD Mimics from the Natural Product by a Novel Biosystem- Antiinflammatory Effect of *Morus alba*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 29(1):1~7, 1998

Chommnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS and Gritsanapan W., Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Ethnopharmacol*, 101(1-3):330~333, 2005

Chung JH, Hanft VN and Kang S., Aging and photoaging. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 49(4):690~697, 2003

Cunliff WJ., Acne and unemployment. *Br. J. Dermatol.*, 115(3):386, 1986

Davidson PM and Parish ME. Method for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* 43:148~155, 1989

Dawley RM and Flurkey WH., 4-hexylresocinol a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. *J. Food Sci.*, 58:609~616, 1993

Ducan PE, Griffin JP and Solomon SS., Bronchodilator drug efficacy via cyclic AMP. *Thorax.* 30(2) 192~196, 1957

Dullo AG, Seydoux J and Girardier L., Peripheral mechanism of thermogenesis induced by ephedrine and caffeine in brown adipose tissue. *Int J Obes.* 15(5):317~326, 1991

Elliott DC, Schultz CG and Cassar RA., Betacyanin decolourizing enzyme in *Amaranthus tricolor* seedlings. *Phytochemistry.* 22(2):382~387, 1983

Funasaka Y, Chakraborty AK, Komoto M, Ohashi A and Ichihashi M., The depigmenting effect of alpha tocophenyl ferulate on human melanoma cells. *Br. J. Dermatol.* 141(1):20~29, 1999.

Friedman PS, Wren F, Buffey J and MACNEIL S., α -MSH causes a small rise in cAMP but has no effect on basal or ultraviolet-stimulated melanogenesis in human melanocytes. *Br. J. Dermatol.* 123:145~151, 1990

Gray JI and Dugan LR Jr., Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J. Food Sci.*, 40(5):981~982, 1975

Han SM, Lee KG, Yeao JH, Kweon HY and Park KK., Anti-inflammatory effect of the venom from asian honeybees (*Apos cerana* L.) on inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in Raw 264.7 cell line. *Korean J. Apoculture.*, 19(2):89~96, 2004

Han WS., Isolation of the Antimicrobial Compounds from *Aralia cordata* Thunb Extract. *Korena j. Medicinal Crop Sci.*, 13(4):182~185, 2005

Hara M, Yaar M, Byers HR, Goukassian D, Fine RE, Gonsalves J and Gilchrest BA., Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J. Invest. Dermatol.*, 114:438~443, 2000.

Heaing VJ and Ekel TM., Mammalian Tyrosinase. *Biochem.*, 157:549~557, 1976

Heaton T, Maon D, Venaille T and Hoit P., *Staphylococcal enterotoxin* induced IL-5 stimulation as a cofactor in the pathogenesis of atopic disease the hygiene hypothesis in reverse. *Allergy.*, 58:252~256, 2003

Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yu CY, Shin HM, Kwon TK, Lee SH., Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J. Food Preserv.*, 13(1):83~87, 2006

Hering VJ, Jimenez M., Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.*, 19(12): 1141~1147, 1987

Hosoi J, Abe E, Suda T and Kuroki T., Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid. *Cancer Res.*, 45(4):1474~1478, 1985

Hunt G, Todd C, Cresswell JE and Thody AJ., α -melanocyte stimulating hormone and its analogue $\text{Nle}^4\text{DPhe}^7\alpha$ -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell. Sci.*, 107:205~211, 1994

Hyun SH, Jung SK, Jwa KM, Song CK, Kim JH and Lim SB., Screening of Antioxidants and Cosmeceuticals from Natural plant Resources in Jeju island. *KOREAN J. FOOD SCI TECHNOL.*, 39(2):200~208, 2007

Hwang EY, Kong YH, Lee YC, Kim YC, Yoo KM, Jo YO and Choi SY., Comparison of Phenolic Compounds Contents Between White and Red ginseng and Their Inhibitory Effect on Melanin Biosynthesis. *J. Ginseng Res.*, 30(2):82~87. 2006

Ikeda T and Tsutsumi T., Function and skin depigmental activity of crude drugs, *Fragrance J.*, 6:56, 1990

Ishitsu H, Ohsawa C, Ohiwa T, Umeda I and Suhara Y., Anti-picornavirus Flavone Ro 09-0179. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22(4):611~616, 1982

Itokawa HI, Stuo K and Takeya K., Structures of Iso Agastachoside and Agastachin New Glucosyl Flavones Isolated from *Agastache Rugosa*, *Chem. Pharm. Bull.*, 29:1777~1779, 1981

Jang HW, Jung JO and Lee KG., Analysis of Volatile Constituents in *Plantago asiatica* L. and *Erigeron annuus* L. Isolated by SAFE (Solvent Assisted Flavor Evaporation) Apparatus. *Food Engineering Progress* 9(3):192~198, 2005

Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ and Mossman BT., Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest.*, 69:26~274, 1993

Jeon ES, Han MD and Kim HD., Antimicrobial Activity of *Streptococcus mutans* by *Schizandrae fructus* and *Evodiae Fructus* extracts. *Journal of Dental Hygiene Science.*, 3(1):39~44, 2003

Jeon SM., Antioxidative components of *Suaeda Asparagoides* and its application to cosmetics. *Seoul National University of Technology.*, p35, 2007

Jeon YO, Kim KH, Kim SI and Han YS., Screening of Antimicrobial activity of the Plantain (*Plantago asiatica* L.) extract. *Korean J. Soc Food Sci.*, 14(5):39~45, 1998

Jeong CH, Bae YI, Shim KH and Choi JS., DPPH Radical Scavenging Effect and Antimicrobial Activities of Plantain (*Plantago asiatica* L.) Extracts. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.*, 33(10):1601~1605, 2004

Jeong YT., A study on the antimicrobial and antioxidant effect of white Lilies Extracts. *Korean. J. Beauty Design.*, 2(1):75~81, 2006

Jeong YT., A study on the Active oxygen and Tyrosinase Inhibition effect

of white Lotus Extracts. *Korean. J. Beauty Design.*, 1(1):47~51, 2005

Jin MH, Kim HJ, Kang SJ, Kang SH, Kim CH and Jung MH., Three Melanogenesis Inhibitors from the Root of *Veratrum nigrum*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 33(4): 399~403, 2002

Joo EY, Lee YS and Kim NW., Polyphenol Compound Contents and Physiological Activities in various extracts of the *Vitex rotundifolia* Stems. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.*, 36(7):813~818, 2007

Jung SH, Jo WA, Son JH, Park CI, Lee IC, An BJ, Son AR, Kim SK, Kim YS, Jung YS, Kang BY and Choi EY., A Study on the Application of New Cosmetic Materials of Whitening Effect and the Physiological Activities of Chestnut Inner Shell. *Kor. J. Herbology.*, 20(2):27~33, 2005

Kagawa K, Tokura K, Uchida K, Kakushi H, Shike T and Nakai H., Platelet aggregation inhibitors and inotropic constituents in *Pyrolae herba*. *Chem. Pharm. Bull.*, 40:2083~2087, 1992

Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Saka C, Kondoh S, Nishiyama S and Urabe K, Hearing VJ., Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase related protein1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.*, 100(2):126~131. 1993

Kang BS., Medical herbs. Young-Ryu-Sa. Seoul. pp.384~386, 1992

Kearney JN, Harnby D, Gowland G and Holland KT., The follicular

distribution and abundance of resident bacteria on human Skin, *J. Gen. Microbiol.*, 130(4):797~801, 1984

Kim BN, Zhoh CK and Shin GH., Studies on the Antioxidative and Antimicrobial Effects of *Lespedeza bicolor* Extracts. *Journal of the Korean Society of Esthetic & Comeceutics*. 12(2):109~120, 2006

Kim IC., Antioxidative Property and Whitening Effect of the *Polygoni Multiflori Radix*, *Polygonati Rhizoma* and *Ephedrae Herba*. *Journal of The Korean Oil Chemists` Sco.*, 25(4):533~538, 2008

Kim IC., Antioxidative Property and Whitening Effect of the *Pueraria Radix*, *Poria Cococ* and *Coptidis Rhizoma*. *Journal of The Korean Oil Chemists` Sco.*, 25(2):219~225, 2008

Kim HS and Joung SW., Effective Components and Nitrite Scavenging Ability of Root and Leaver a *Angelica gigas* Nakai. *Korean J. Food Cookery SCI.*, 22(6):957~965, 2006

Kim JS, Jun BD., Effects of cortex Mori on Mesenteric Mast Cells of the Rat. 전북대학교 논문집 제10호

Kim JM, Cha DS, Jeon SR, Jeon H, Lim PJ, Choi H, Lee KJ, Kang MS, Na HJ, Kim MY, Leem KH, Kim HC and Bu YM., Neuroprotective Effect of the Roots of *Polygonum Cuspidatum* on Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Kor. J. Herbology.*, 23(2):225~233, 2008

Kim JH, Kim HD, You HJ, Kim HC, Kwon MC, Seong NS, Lee SE and Lee HY., Immuno-regulatory Activities of Various Fractions from *Ephedrae Sinica* STAPF, *Rubus Coreanus* Miq. And *Angelica gigas* Nakai Extracts with Ultrasonification. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 13 (4):161~170, 2005

Kim JS, Kang SS., Saponins from the aerial parts of *Aralia continentalis* *Natur. Prod. Sci.*, 4(1):45~50. 1998

Kim JS, Shim SH, Xu Y, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP, and Bae K., Phenolic glycosides from *Pyrola japonica*. *Chem. Pharm. Bull.*, 52(6): 714~717, 2004

Kim KH, Kim SI and Han YS., Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Plantain (*Plantago asiatica* L.). *Korean J. Soc. Food Sci.*, 15(4):410~417, 1999

Kim SI., Taxonomic Studies of Genus *Juniperus*. *Jour. Korean For. Soc.*, 77(3):338~350. 1988

Kim YH and Park YS., Effect of *Acanthopanaxis corlex* Water Extract on Antioxidative Activity, Lipid Profile and Epidermal Thickness in DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis Animal Model. *KOREAN J FOOD SCI. TECHNOL.*, 38(5):668~673, 2006

Kim HT, Yang KS, Hwang EZ and Park SB., Effect of *Ephedrae Herba* on the Immune Response in Mic. *Kor. J. Pharmacogn.*, 22(3):183~191, 1991

Kim ST, Ahn SH, Kim JD and Kim YK., Protective Effect of MeOH Extract of *Evodia officinalis* on Cyanide-induced Neurotoxicity in Cultured Neuroblastoma Cells. *Kor. J. Pharmacogn.*, 34(4):282~287, 2003

Kim YH, Lee SM, Cheon SJ, Jang MJ, Jun DH, Choi HJ, Cho WA and Lee JT., Study on Anti-oxidant Activity of Four kinds of Korea Herb Medicine Materials. *Journal of the Korean Society of Fashion & Beauty.*, 5(4): 139~144, 2007

Kim YH, Jeo WA, Jang MJ, Cheon SJ, Sung JY, Jeong YS, Kang BY, Son AR, Lee CE, An BJ and Lee JT., Study on the Whitening Effect and Cosmeceutical Activities of *Semen Armeniaceae*. *The Journal of Applied Oriental Medicine.*, 7(1):35~39, 2007

Kim YH, Lee Si, Cheon SJ, Jang MJ, Jun DH, Choi HJ, Cho WA and Lee J T., Study on Cosmeceutical Activity of four Kinds of Korea Herb Medicine Msterials. *Journal of the Korean Society of Fashion & Beauty.*, 5(4): 130~138, 2007

Kligman AM and Lavker RM. Cutaneous aging: the difference between intrinsic aging and photoaging. *J. Cut. Aging Cosmet. Dermatol.*, 1:5~11, 1988

Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, Mure T, Yamazawa H and Yamamoto T., Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 33(12): 5355~5357, 1985

Lawson V, Lewis-Jones MS, Finlay AY, Reid P and Owens RG., The family impact of childhood atopic dermatitis: the Dermatitis Family Impact Questionnaire. *Br J Dermatol.*, 138(1):107~113, 1998

Lee ES and Seo BI., Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Agrimonia pilosa* Ledeb extract. *The Journal of Applied Oriental Medicine.*, 3(1):37-42, 2003

Lee ES and Seo BI., Growth inhibition of *Streptococcus pyogenes* KCTC3208 by *Agrimonia pilosa* Ledeb. Extract. *The Journal of Applied Oriental Medicine.*, 5(1):27~32, 2005

Lee HS, Yun SJ, Moon YK and Miin JY., Hair Growth effects of Mori Cortex Radicis Mixture on the hair of rat. *Korean J. Seric. Sci.*, 42(2):83-85, 2000

Lee IS, Im HG and Lee SO., Growth Inhibition of *Helicobacter pylorio* by *Reynoutria elliptica* Migo. *Korean J. Food Sci Technol.*, 35(6):1182~1186, 2003

Lee JJ, Lee JH, Jeong CJ, Choi HS and Lee MY., Effects of Ethylacetate Fraction of *Plantago asiatica* L. on Hypercholesterolemia Induced by High Cholesterol Diet in Rats. *Korean J. Food Preserv.*, 12(6):624-630, 2005

Lee JY, Kang JR and Whang WK., Antioxidant Activity of MeOH Extract of Aerial part from *Agastache Rubosa* O. Kuutze. *J Kor Soc Cosm.*, 13(3): 1396-1403, 2007

Lee JS, Park WD, Jang HG, Kim CY, Park YS, Kim TC and Heo BG., Total Phenol Content, Electron Donating Ability, and Tyrosinase Inhibition Activity of Pear Cut Branch Extract. *Kor J. Hort. Sci Technol.*, 24(3):338-341, 2006

Lee KK., Antimicrobial Activity of *Thuja orientalis* and *Chamaecyparis obtuse* Essential oil. *Journal of Korean Beauty Society.*, 5(2):567~577, 1999

Lee MK, Myung KB and Kook HI., Comparative study for the cosmedolytic effects of several topical acne remedies on experimentally induced comedones in Rabbits. *Kor. J. Dermatol.*, 28(5):543~549, 1990

Lee SM, Lee JI, Chai OH, Bae HW and Song CH., Effects of cortex Mori on the activation of rat peritoneal mast cells by human seminal plasma. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol.*, 19(5):666~676, 1999

Lee SE, Park CG, Cha MS, Kim JK, Seong NS, Bang KH and Bang JK., Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Mentha arvensis* L var *piperascens* Malivaud and *Agastache rugosa* O. Kuntze on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 10(3):206~211, 2002

Lee SM, An RB, Min BS, Na MK, Lee CH, Kang SJ, Maeng HY and Bae KH., A new naphthoquinone from *Pyrola japonica*. *Arch. Pharm. Res.*, 24(6):522~523, 2001

Lee SH, Hong SH, Hwang CY and Kim NK., Effect of Methanolic Extract from *Biota Orientalis Folium* on Melanin Synthesis. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.*, 19(3):662~670, 2005

Lim CH., Antioxidant Effects of *Scutellaria baicalensis* on human HaCat keratinocytes. Graduate School of Dongshin University. pp 25~34. 2007

Lim JA, Bhatt LR, Na YS, Lee JS and Baek SH., Antimicrobial Effects of Essential Oil from *Artemisia Vulgaris* on Skin Disease Bacteria. *J. Kor. Soc. Cosm.*, 10(3):219~222. 2004

Macrae R, Robinson RK and Sadler MJ., Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press. New York, NY. pp3240~3249, 1993.

Maeda K and Fukuda M., *In vivo* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosment Chem*, 42:361~368, 1991

McGinley KJ, Webster GF, Ruggieri MR, Leydenet JJ., Regional variation in density of cutaneous propionibacteria correlation of *Propionibacterium acnes* populations with sebaceous secretion. *J. clin. Microbiol.*, 12(5): 627~675, 1980

Mijachi Y., Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol sci.* 9(2) :79~86, 1995

Min KJ, Song JW and Cha CG., The Antioxidative and Antitumor Activity of Extracts of *Agrimonia Pilosa*. *J FD Hyg. Safety.*, 23(2):149~156, 2008

MoK JS, Song KC, Choi NJ and Yang HS., Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Root Bark of *Morus alba* against Selected fish Pathogenic Bacteria. *J. of Aquaculture*, 14(4): 221~226, 2001

Molina-Jimenez MF, Sanchez-Reus MI, Andres D, Cascales M, Benedi J., Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Brain Res.*, 1009(1-2):9~16, 2004

Mosmann T., Rapid colormetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. immun. Methods*, 65 (1-2):55~63, 1983

Nakasato T, Asada A and Marui K., Dehydroevodiamine, Main Alkaloid from the Leaves of *Evodia rutaecarpa* Hooker fil. et Thomson. *Yokugaku Zasshi.*, 82:619~626, 1962

Odom RB, James WD and Berger TG., Andrew`s diseases of the skin. 9 th ed. Philadelphia, WB Saunders., p379~386, 2000

Oh BT, Kim CH and Cho SH., Antimicrobial Characteristics of *Thuja orientalis* Leaf Extracts. *J. Agriculture & Life Sciences.*, 40(1):21~26, 2006

O'Toole EA, Goel M and Woodly DT., Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration, *Dermatol Surg.*, 22(6):525~529, 1996

Oh SM., Screening of Natural Antibacterial Agents from Medicinal Plants against Acne Microorganisms. The Graduate school of Engineering. Yousei University., p1, 2006

Ortonne JP., Photoprotective properties of skin melanin. *BR. J. Dermatol.*, 146(61):7~10, 2002.

Ozeki Y, Davies E and Takeda J., Structure and expression of chalcone synthesis gene in carrot suspension cultured cells regulated by 2,4-D. *plant cell physiol.*, 34(7):1029~1037, 1993

Park DJ and Lee JC., A Study on the Antioxidative and Depigmentation Activities of the Ethanol Extract of *Saururus Herba*. *Kor. J. Herbology.*, 23(2):193~202, 2008

Park HG, Cha MR, Hwang JH, Kim JY, Choi SU, Park HR and Hwang YI., Antimicrobial Activity of the Extract from *Pyrola japonica* against *Bacillus subtilis*. *J. Life Sci.*, 16(6):989~993, 2006

Park HJ, Kwon SH, Lee MS, Kim GT, Choi MY and Jung WT., Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Herbs of *Agastache rugosa* and Its Composition. *J. Korean Soc. Food Sci. Nut.*, 29(6):1123~1126, 2000

Park HJ, Hong MS, Lee JS, Lee KH, Kim CJ, Kim JW and Lim S., Effects of

Aralia continentalis Hyperalgesia with peripheral inflammation. *Phytother. Res.*, 19(6):511~513, 2005

Park SS, Ryu YB, Lee YH, Cho YU, Cho SJ, Choi YJ, Park KH and Gal SW., Inhibition of Melanin Synthesis by Mycelial Culture Broth of *Paecilomyces japonica* in the Mulberry Leaf Extract. *J. Life Sci.*, 17(6):816~821, 2007

Park SN., Antioxidative Properties of Baicalein, Component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and Its Application to Cosmetics. *J. Koreana Ind. Eng. Chem.*, 14(5):657~665, 2003

Park SN., Skin aging and reaction oxygen species. *J. Seoul National Univ of Technolgy.*, 50:329~341, 1999

Park UY, Kim YM, Kim SH and Chang DS., Investigation of Optimum Extracting Condition and Antimicrobial Activity of the Extract from the Root Bark of *Morus alba*. *J Fd Hyg. Safety.*, 10(3):139~145, 1995

Qui F, Komatsu KL, Satio KI, Kawasaki K, Yao K and Kano Y., Pharmacological properties of traditional medicines. XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat. *Biol. Pharm. Bull.*, 19 (11):1463~1467, 1996

Rho TC, Choi HC, Lee SW, Kim YH, Rho MC, Kim YK and Lee HS., Inhibition of Nitric Oxide Synthesis by Coumarins from *Polygonum cuspidatum* in LPS-Activated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn.*, 32(3):181~188, 2001

Roberts SOB., *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. *Br. J. Dermatol.*, 81(4): 264~269, 1969

Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W and Zlabinger GJ., A microplate assay for the detection of oxidative product using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods*. 156(1): 39~45, 1992

Ryu IS., A study of Aermal Bioactive Properties of the Ethanol Extract from Flowers of *Lespedeza bicolor*. Wonkawang University., 2007

Ryu KS and Ahn DK., Studies on Root Bark of mulberry Tree (1) Bibliographical Analysis on *Mori Cortex Radicis* in herbal and Fomularies. *Kor. J.armacog.*, 11(2):85~89. 1980

Seong JM, Park NY and Lee SH., Effect of *Schizandra chinensis* and Pine Neddle on Growth of Pathogens Relate to Acne. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 23(1):69~74, 2003

Seo HS, Chung BH and Cho YG., Antioxidant and Anticancer Effects of Agrimony (*Agrimonia pilosa* L.) and Chinese Lizardtail (*Saururus chinensis* Baill). *Korean J. Medicinak Crop Sci.*, 16 (3):139~143, 2008

Seo WT, Yang JK, Kang BK, Park WJ, Hong CS, Kang YM, Jung HY and Kim YD, Kang S., Extraction and Biological Activities of Essential Oil from *Thuja occidental* Leaves. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 11(5):364~370, 2003

Smolinski KN and Yan AC., Acne update. *Curr Opin Pediatr.* 16(4):385-391, 2004

Sohn HY, Kim YS, Kum EJ, Kwon YS and Son KH., Screening of Anti-acne Activity of Natural Products against *Propionibacterium acnes*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 34(3):265~272, 2006

Sung BC, Yang BR, Chun WC, Kim SI and Park KS., Antibacterial Activities against Plant Pathogens and Identification of Agrimol B from *Agrimonia pilosa* LEDEB. *The korena Journal of Pesticide Science.*, 10(3):230~ 236, 2006

Swaim T, Hillis WE, Ortega M., The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.-The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, 10(1):83~88, 1959

Tak MJ, Jung IK, Kim DK, Jung HS and Lee CH., Influence of Extracts of *Biotae Orientalis* on the Efficiency of Hair Growth in Hair Removed C57BL/6N Mice. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.*, 21(1):136~144, 2007

Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho C, Zhu Z and Rosen RT., Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agric. Food. Chem.*, 48(2):253~256, 2000

Voegeli R., Elastase and tryptase determination on Human Skin Surface. *Cosmetic & Toiletries.*, 111:51~58, 1996

Wiedow O, Schröder JM, Gregory H, Young JA and Christophers E., Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 265(25):14791~14801, 1990

Wills BK, Aks S, Maloney GE, Rhee J, Brand R and Sekosan M., The effect of amifostine a cytoprotective agent on paraquat toxicity in mice. *J Med Toxicol*, 3(1):1~6, 2007

Winston MH and Shalita AR., *Acne vulgaris*. Pathogenesis and treatment. *Pediatr. Clin. North Am.*, 38(4):889~903, 1991

Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schüller J and Scharffetter-Kochanek K., Solar UV irradiation and dermal photoaging” , *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 63(1-3):41~51, 2001

Won YJ, Na MS and Lee MY., Effects of Ethylacetate Fraction of Plantain (*Plantago asiatica* L.) on Experimentally-Induced Gastric Mucosal Damage and Gastric Ulcers in Rats. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.*, 33(4):659~776, 2004

Yagi A, Kanbara T and Morinobu N., The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *planta Medica.*, 3981:517~519, 1986

Yoo JY, Park SH, Hwang IA, Jo SJ, Huh CH, Youn SW and Park KC., A Clinical Study on the Effect of a Cream Containing Ramulus Mori Extract

and Tea Tree Oil on Acne Vulgaris and Aerobic Skin Flora. *Korean J Dermatol.*, 41(9):1136-1141, 2003

Yoo YG, Jeung MS, Choi SW and Kim JH., The Study on the Whitening Effect of *Ephedra sinica* Extract. *J. cosmet. scientists Korea*, 31(2):153-159, 2005

You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW and Choe M., Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of *Paeonia suffruticosa* Water Extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 38(3):292-296, 2009

Yun HJ, Heo KH, Lee YT, Park W and Park SD., Anti-inflammatory Effect of *Evodia officinalis* DODE in Mouse Macrophage and Human Vascular Endothelial Cells. *Kor. J. Herbology.*, 23(1):29-38, 2008

Zhang JG, Nicholls-Grzemeski FA, Tirmenstein MA and Fariss MW., Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chem. Biol. Interact.*, 138(3):267-284, 2001

저작물 이용 허락서

학 과	생명공학과	학 번	20067303	과 정	박사
성 명	한글 : 류 민정 한문 : 柳 敏 貞 영문 : Ryu, Min Jeong				
주 소	광주 광역시 북구 우산동 183-27번지				
연락처	E-MAIL : jemine0806@hanamil.net				
논문제목	한글 : 약용식물 추출물의 피부기능성에 관한 연구 영어 : Skin functional activities of the extracts from various medicinal plants				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2009년 7 월 13 일

저작자: 유민정

(서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하